

Histon-Acetylierung ist essentiell
für die Spermatidenentwicklung von
histonbasiertem zu protaminbasiertem Chromatin
in
Drosophila melanogaster

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephan Awe
aus Verden a. d. Aller

Marburg/Lahn 2010



Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachterin: Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachterin: Prof. Dr. M. Hassel

Termin der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

In der Spermatogenese vieler Tiere wird die histonbasierte Chromatinstruktur des paternalen Genoms aufgelöst, um durch eine Struktur auf Grundlage von Protaminen ersetzt zu werden. Der korrekte Ablauf dieses Histon-Protamin Wechsels (H-P Wechsel) ist essentiell für die männliche Fertilität. Der H-P Wechsel findet auch in den Spermatiden von *Drosophila* statt. Bisher war nicht bekannt, in welchem Zeitrahmen der H-P Wechsel innerhalb der postmeiotischen Entwicklung abläuft. In dieser Arbeit wurde dazu ein Kultursystem für isolierte, pupale Testes und einzelne Spermatidenverbände (Zysten) etabliert. Mit Hilfe von Histon-RFP- und Protamin-eGFP-exprimierenden Fliegen wurde in fluoreszenzmikroskopischen Zeitraffer-Aufnahmen die Entwicklung isolierter Zysten durch die Meiose und den H-P Wechsel *in vivo* beobachtet. Der H-P Wechsel findet 50-60 h nach der Meiose statt und ist innerhalb von 5 h abgeschlossen. Sowohl bei Vertebraten als auch bei *Drosophila* geht dem H-P Wechsel eine Hyperacetylierung des Histons H4 voraus und er wird begleitet von DNA-Strangbrüchen. Im Säuger-Modell werden die Histon H4-Hyperacetylierung als mögliches Startsignal des H-P Wechsels und Topoisomerasen als verantwortlich für die DNA-Strangbrüche angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob diese Annahmen auch für die Spermatogenese von *Drosophila* zutreffen. Durch Inhibitorbehandlung von pupalen Testes und isolierten Zysten in Kultur wurde die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) manipuliert. Histon-Acetylierung zeigte sich als essentiell für die korrekte Entwicklung postmeiotischer Keimzellen. Allerdings induzierte eine HDAC-Inhibitor-vermittelte, vorzeitige Histon-Acetylierung kein vorzeitiges Auftreten von Merkmalen des H-P Wechsels. Histon H4-Acetylierung ist somit nicht hinreichend als das alleinige Startsignal des H-P Wechsels in *Drosophila*. Die Inhibition von Topoisomerasen des Typs I und II zeigte keinen Effekt auf den H-P Wechsel und die Entwicklung postmeiotischer Spermatiden. Ein Zusammenhang zwischen Topoisomeraseaktivität und DNA-Brüchen in Spermatiden von *Drosophila* scheint daher nicht zu bestehen.

Bisher war nicht bekannt, welche HATs an der Histon H4-Acetylierung des H-P Wechsels beteiligt sind. Nach manueller, stadienspezifischer Isolation von Einzelzysten konnte hier mittels RT-PCR die Expression einiger HATs während des H-P Wechsels geprüft werden und ein Kandidat identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurden genutzt, um ein Arbeitsmodell zum molekularen Ablauf des H-P Wechsels aufzustellen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Morphologie adulter und pupaler Testes in <i>Drosophila melanogaster</i> . .	8
1.2	Verlauf der prämeiotischen Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.3	Verlauf der postmeiotischen Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.4	Die Chromatinkondensation durch den Histon-Protamin Wechsel	13
1.4.1	Hyperacetyliertes Histon H4 markiert den Beginn des Histon- Protamin Wechsels	14
1.4.2	Proteasomen-vermittelter Histonabbau	15
1.4.3	Transitionsphase und DNA-Strangbrüche	16
1.4.4	Die Anlagerung der Protamine beendet den Histon-Protamin Wechsel	18
1.5	Arbeitsmodell zum molekularen Mechanismus des Histon-Protamin Wech- sels in <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.6	Fragestellung	20
2	Material	22
2.1	Geräte	22
2.2	Chemikalien	22
2.3	Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen	23
2.4	Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) und Molekulargewicht-Standards	23
2.5	Antikörper	24
2.6	Enzyme	25
2.7	<i>Drosophila melanogaster</i> -Stämme	25
2.8	Synthetische Oligonukleotide	25
2.9	Software und Internetdatenbanken	26

3	Methoden	27
3.1	Versuchstier <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.1.1	Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i> im Labor	27
3.1.2	Kreuzung von <i>Drosophila melanogaster</i> -Linien	27
3.2	Organkultur von intakten, pupalen <i>Drosophila</i> -Testes und Primärkultur von isolierten Zysten	28
3.2.1	Kulturmedium	28
3.2.2	Organkultur intakter, pupaler Testes von <i>Drosophila melanogaster</i>	29
3.2.3	Kultur intakter Zysten aus <i>Drosophila melanogaster</i> -Testes	29
3.2.4	Inhibitorbehandlung von kultivierten Testes und Zysten	29
3.2.5	Zeitrafferaufnahmen von isolierten Zysten	30
3.3	Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren	31
3.3.1	Extraktion genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	31
3.3.2	Amplifikation definierter DNA-Sequenzen mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	31
3.3.3	Agarosegelelektrophorese	32
3.3.4	Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)	33
3.4	Histologische Methoden	35
3.4.1	Immunhistologische Analysen an Quetschpräparaten von <i>Droso- phila</i> -Testes	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Zeitrahen der Spermiogenese und des Histon-Protamin Wechsels in <i>Drosophila melanogaster</i>	37
4.1.1	Keimzellen in isolierten Zysten entwickeln sich in Kultur durch die Meiose und den Histon-Protamin Wechsel	37
4.1.2	Innerhalb von fünf Stunden wechselt das Chromatin in kultivier- ten Spermatiden von einer histonbasierten zu einer protaminba- sierten Struktur	40
4.2	Bedeutung der Histon-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel	42
4.2.1	Anacardsäure (AA), aber nicht Trichostatin A (TSA), verhindert den Wechsel zu protaminbasiertem Chromatin in pupalen Testes	45
4.2.2	Anacardsäure verhindert die Acetylierung von Histon H4, während Trichostatin A verfrühte H4-Acetylierung auslöst	47

4.2.3	Anacardsäure-bedingter Mangel an Histon-Acetylierung führt zu Entwicklungsstopp isolierter Zysten, während TSA-induzierte Histon-Acetylierung die weitere Entwicklung nicht verhindert	49
4.2.4	TSA-vermittelte, verfrühte Acetylierung von Histonen induziert keine verfrühten DNA-Strangbrüche	50
4.2.5	Die von Anacardsäure ausgelöste Chromatinkondensation und Entwicklungsblockade ist nicht auf zytotoxische Nebenwirkungen zurückzuführen	52
4.2.6	Expression von Histon-Acetyltransferasen im Histon-Protamin Wechsel von <i>Drosophila</i> -Spermatiden	55
4.3	Inhibition des Proteasoms durch Epoxomycin verhindert das Auftreten von Protamin-exprimierenden Spermatiden	58
4.4	Inhibition der Topoisomerase I- und II-Aktivität hat keinen Einfluss auf die postmeiotische Entwicklung von <i>Drosophila</i> -Spermatiden	60
5	Diskussion	64
5.1	Spermatiden in isolierten Zysten in Kultur durchlaufen die Meiose und innerhalb von 5 Stunden den vollständigen Histon-Protamin Wechsel	64
5.2	Bedeutung der Histon-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel	66
5.2.1	Histon-Acetylierung ist nicht hinreichend, um den Histon-Protamin Wechsel zu induzieren	67
5.2.2	Histon-Acetylierung ist essentiell für die Entwicklung von Spermatiden mit protaminbasiertem Chromatin	68
5.2.3	Die Rolle der Histon H4-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel von <i>Drosophila</i>	68
5.2.4	CG2051 und PCAF sind Histon-Acetyltransferasen mit einer postmeiotischen Expression in <i>Drosophila</i> -Spermatiden	70
5.3	Epoxomycin-vermittelte Inhibition des Proteasoms verhindert die Weiterentwicklung postmeiotischer Spermatiden von <i>Drosophila</i>	71
5.4	Die DNA-Brüche des Histon-Protamin Wechsels stehen möglicherweise nicht in Verbindung mit Topoisomerase-Aktivität	72
5.5	Neues Arbeitsmodell zum Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels	76
5.6	Ausblick	78
	Literaturverzeichnis	80

A	Abkürzungen	92
B	Lebenslauf	93
C	Danksagung	94
D	Erklärung	95

1 Einleitung

Nur einmal während des Lebenszyklus vieler Tierarten und auch des Menschen liegt das Genom nicht in der histon gebundenen, nukleosomalen Chromatinstruktur vor, sondern in einer viel kompakteren, auf Protaminen beruhenden Struktur. Der Wechsel von den Histonen zu den Protaminen findet während der männlichen Keimzellbildung im haploiden Zustand statt und sein korrekter Ablauf ist essentiell für die Fertilität der entstehenden Spermien (Übersichtsartikel: Carrell et al., 2007). Für die Erforschung des Histon-Protamin Wechsels (H-P Wechsel) bietet sich die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* aufgrund der guten methodischen Zugänglichkeit und der umfassenden Infrastruktur zum Modellorganismus *Drosophila* an. Das Hauptthema der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Bedeutung von acetyliertem Histon H4 sowie der Aktivität von Topoisomerasen und des Proteasoms für den H-P Wechsel in reifenden *Drosophila*-Spermatiden.

1.1 Morphologie adulter und pupaler Testes in *Drosophila melanogaster*

Adulte *Drosophila*-Männchen tragen zwei schlauchförmige, schneckenartig aufgerollte Testes (Abb. 1.1 A, S. 10). In der distalen Spitze jedes Testis liegt das Keimzentrum, in dem die Entwicklung der Spermien beginnt und von dem aus die reifenden Keimzellen den Testis hinabdrängen. Auf diese Weise finden sich die fertigen Spermien am proximalen Ende des Schlauches, wo sie in die Samenblase entlassen werden (Fuller, 1993). Über die Samenblase ist der adulte Testis mit den weiteren Fortpflanzungsorganen, z.B. den Paragonien (Anhangsdrüsen), verbunden. Allerdings entwickeln sich die Testes unabhängig von den anderen Fortpflanzungsorganen, die von einer Imaginalscheibe gebildet werden (Bodenstein, 1950). Im dritten Larvenstadium liegen die Testes noch ohne Verbindung zu anderen Organen, mit Ausnahme des Fettkörpers, vor. Sie sind hier zunächst noch linsenförmig und enthalten nur prämeiotische Stadien der Sper-

matogenese (Fuller, 1993; Renkawitz-Pohl et al., 2005). In der frühen Puppenphase wird zunächst auch die Verbindung zum Fettkörper aufgegeben und die jetzt eher birnenförmigen Testes enthalten nun auch postmeiotische Spermatiden (Abb. 1.1 B). In späteren Puppenphasen wachsen die Ausläufer der Fortpflanzungsorgane den Testes entgegen. Erst nach dem ersten Kontakt beginnen die Testes mit der Elongation und bilden ihre schneckenartige Form aus (Bodenstein, 1950).

1.2 Verlauf der prämeiotischen Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Im Keimzentrum am distalen Ende des Testis von *Drosophila* liegen die Keimbahn-Stammzellen. Sie bilden gemeinsam mit den regulatorischen, somatischen Hub-Zellen eine Stammzellnische (Fuller, 1998). Nach einer asymmetrischen Teilung einer Keimbahn-Stammzelle verlässt eine der Tochterzellen die Stammzellnische und differenziert zur Spermatogonie (Yamashita et al., 2003). Diese Zelle wird sogleich von zwei somatischen Zysten-Zellen umschlossen, deren Stammzellen ebenfalls in engem Kontakt zu den Hub-Zellen liegen. Spermatogonie und Zysten-Zellen bilden eine Einheit, die als Zyste bezeichnet wird. Im Innern der Zyste spielt sich die Bildung reifer Spermien aus der Spermatogonie ab (Hardy et al., 1979). Während der gesamten folgenden Entwicklung teilen sich die Zysten-Zellen nicht, sondern umschließen jeweils eine Hälfte der sich entwickelnden Spermatidenbündel (Tokuyasu et al., 1972). Die Spermatogonie durchläuft eine Amplifikationsphase mit vier unvollständigen Mitosen, an deren Ende 16 primäre Spermatozyten entstehen (Abb. 1.1 C, 1, S. 10 sowie Abb. 1.2 Spalte 1, S. 12). Diese Zellen sind über Plasmabrücken verbunden und gehen synchron durch die nachfolgenden Entwicklungsschritte (Fuller, 1993). Die 16 primären Spermatozyten einer Zyste beginnen die Meiose mit einer über 3,5 Tage andauernden G₂-Phase, in der verstärkt Transkription stattfindet. Die Nuklei der Zellen wachsen auf das 25-fache des vorherigen Volumens an (Lindsley und Tokuyasu, 1980), bevor mit Beginn der meiotischen Teilungen die Transkription nahezu vollständig eingestellt wird (Olivieri und Olivieri, 1965). Bisher sind nur wenige Gene bekannt, deren Transkription postmeiotisch nachweisbar ist (Bendena et al., 1991; Barreau et al., 2008). Am Ende der Meiose enthalten die Zysten jeweils 64 Spermatiden, die in der weiteren postmeiotischen Entwicklung (Spermiogenese) zu reifen Spermien heranwachsen.

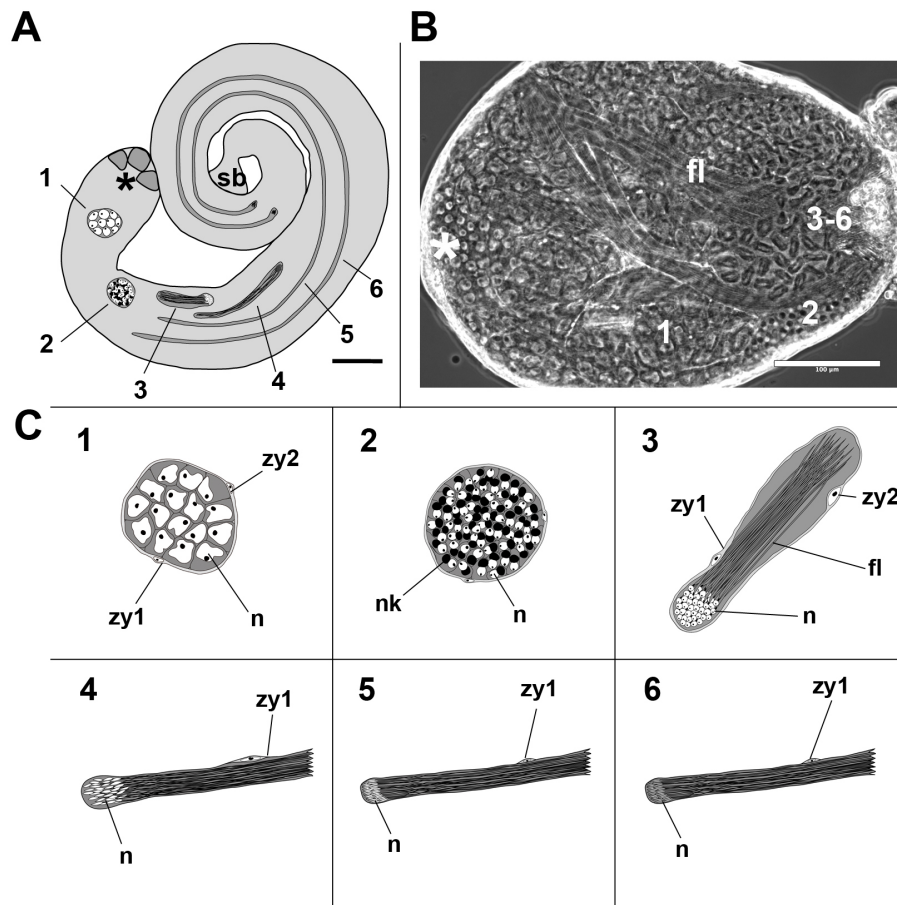


Abbildung 1.1: Morphologie der adulten und pupalen Testes von *Drosophila melanogaster* sowie der sich entwickelnden Spermatiden in ihren Zysten (A) Schematische Darstellung eines adulten Testis. Das Keimzentrum (Stern) mit den Stammzellen der somatischen Zysten-Zellen und der Keimbahnzellen liegt am apikalen Ende des schneckenförmigen Testis. Die Stammzellen schnüren in einer asymmetrischen Teilung Spermatogonien ab, die von zwei Zysten-Zellen umschlossen werden. Es entsteht ein Verband aus den sich synchron entwickelnden Tochterzellen der Spermatogonie und den zwei Zysten-Zellen, die sogenannte Zyste. Die älteren Zysten werden von den nachrückenden Zysten verdrängt, so dass sich entlang des Testis die Entwicklungsstadien aufreihen (1-6; vgl. (C) 1-6). (B) Lebendpräparat eines pupalen Testis ca. 48 h nach der Verpuppung in Phasenkontrastoptik. Der Testis ist birnenförmig und hat noch keinen Kontakt zu anderen Geweben aufgenommen. Die prämeiotischen Stadien liegen in den ersten zwei Dritteln nach dem Keimzentrum (Stern). Im letzten Drittel sind die postmeiotischen Stadien zu finden (2-6). Die Flagellen (fl) der späten Stadien erstrecken sich durch den gesamten Testis. (C) Schematische Darstellung der Morphologie der Entwicklungsstadien einzelner Zysten: 1 - Zyste mit 16 primären Spermatozyten vor der Meiose. 2 - Nebenkern-Stadium; 64 haploide, runde Nuklei mit Nebenkernen, einer Fusion der Mitochondrien. 3 - runde Nuklei-Stadium; runde Spermatidenkerne mit elongierenden Flagellen. 4 - elongierende Nuklei-Stadium; die Nuklei werden ellipsoid und die Flagellen wachsen weiter aus. 5 - frühes Kanu-Stadium; die Nuklei lagern sich enger zusammen und werden schmaler, kanuförmig. 6 - spätes Kanu-Stadium; Kernform unverändert, jedoch weiter verlängerte Flagellen und umgewandelte Chromatinkonfiguration (siehe auch Abb. 1.2, S. 12). Danach werden die Spermatidenkerne schmaler und immer nadelförmiger bis zur Individualisierung und Entlassung in die Samenblase. sb - Samenblase (in A); zy1 + zy2 - Nuklei der zwei Zysten-Zellen; n - Nukleus; nk - Nebenkern; fl - Flagellen. Maßstab in A und B 100 μ m.

1.3 Verlauf der postmeiotischen Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Während der postmeiotischen Entwicklung (Spermiogenese) enthält jede Zyste 64 haploide Spermatiden, deren Zytoplasmabrücken sie zu einem funktionellen Synzytium machen. Die Spermatiden durchlaufen synchron die folgenden, tiefgreifenden Umgestaltungen, bevor sie individualisiert und aus dem Testis entlassen werden.

Noch während der zweiten meiotischen Teilung aggregieren die Mitochondrien und fusionieren zu einem Riesenorganell, das postmeiotisch im Phasenkontrastmikroskop als dunkle Kreisstruktur neben dem ebenfalls runden Nukleus auffällt (Fuller, 1993). Dieses als „Nebenkern“ bezeichnete mitochondrielle Derivat gibt dem ersten postmeiotischen Spermatidenstadium seinen Namen: Nebenkern-Stadium (Abb. 1.1 C, 2, S. 10).

Im Anschluss an dieses Stadium wachsen die Flagellen aus und der Nebenkern zerfällt in zwei Strukturen, die sich entlang des Flagellums ausstrecken (Tokuyasu et al., 1972). Die Nuklei der Spermatiden sind noch immer kreisrund und ordnen sich auf einer Seite der Zyste an. Dieses Stadium mit einer schon leicht elongierten Zystenform wird im folgenden als runde Nuklei-Stadium bezeichnet (Abb. 1.1 C, 3, S. 10 sowie Abb. 1.2 Spalte 2, S. 12).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wächst das Flagellum der Spermatiden weiter aus. Als charakteristisches Merkmal der Stadien bleibt jetzt nur die Kernform, die sich rasch verändert (Fuller, 1993). Die Nuklei beginnen zunächst mit einer leichten Elongation zu einer ellipsoiden Form (elongierende Nuklei-Stadium, Abb. 1.1 C, 4 sowie Abb. 1.2 Spalte 3).

Anschließend zeigt sich das als Kanu-Stadium bezeichnete Stadium, dessen schmale, an eine Kanuform erinnernde Nuklei den Histon-Protamin Wechsel durchlaufen und somit stark kondensiert werden (Abb. 1.1 C, 4 und 5). Der Wechsel der Chromatinorganisation ist äußerlich an der Kernform nicht erkennbar. Erst die Fluoreszenzmarkierung der Histone bzw. Protamine zeigt den Unterschied zwischen frühem Kanu-Stadium mit histonbasiertem Chromatin und spätem Kanu-Stadium mit Chromatin auf Basis der Protamine (Abb. 1.2 Spalten 4 und 5)(Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke et al., 2007)).

Mit Abschluss des Kanu-Stadiums schreitet die Kernumformung weiter voran. Die Nuklei werden noch schmaler und erreichen schließlich die charakteristische Nadelform reifer Spermatiden von *Drosophila* (Abb. 1.2 Spalte 6). Diese Spermatiden werden in einem mit der Apoptose verwandten Prozess individualisiert und aus dem Testis ent-

lassen (Arama et al., 2003, 2006).

Nach Schätzungen aus fixierten Präparaten benötigt die gesamte postmeiotische Entwicklung ab dem Ende der meiotischen Teilungen *in vivo* ca. 96 h (Lindsley und Lifschytz, 1972). Für die Verweildauer in den einzelnen Stadien der Spermiogenese existieren ebenfalls lediglich Schätzungen (Kiefer, 1966; Tokuyasu, 1975; Cross und Shellenbarger, 1979; Liebrich, 1981). Der Zeitraum den der Histon-Protamin Wechsel innerhalb dieser Entwicklung einnimmt ist bisher gänzlich unbekannt.

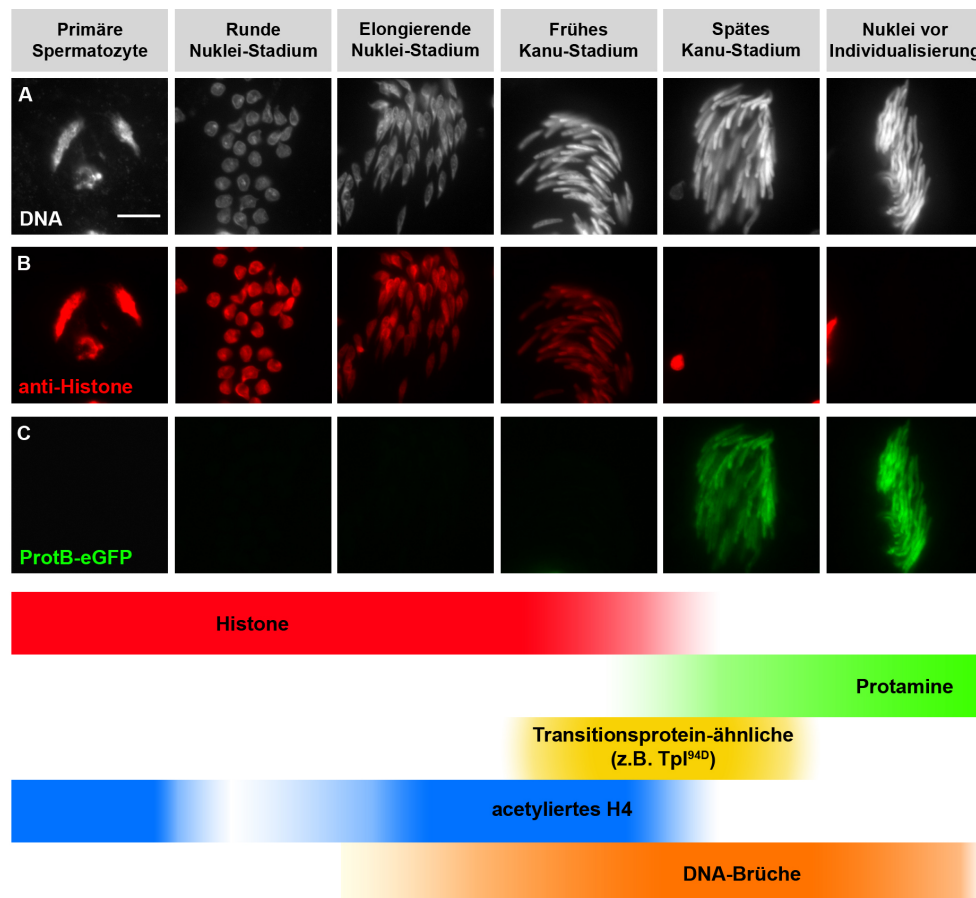


Abbildung 1.2: Kernform und Chromatinkondensation in den Entwicklungsstadien der Nuklei von *Drosophila*-Spermatiden. Immunhistologie bzw. Färbungen an Quetschpräparaten adulter Testes. Reihe A - DNA gefärbt mit Hoechst. Reihe B - Histon-Verteilung markiert mit anti-Histon-Antikörper. C - Protaminexpression visualisiert durch ProtaminB-eGFP. Nach dem postmeiotischen runde Nuklei-Stadium elongieren die Nuklei zu einer ellipsoiden Form und kondensieren dann weiter zu den schmalen Nuklei des frühen Kanu-Stadiums. Histone sind bis zu diesem Stadium detektierbar (Reihe B, Spalte 4). Die Kernform ändert sich nicht wesentlich bis zum späten Kanu-Stadium, jedoch sind hier die Histone abgebaut und Protamine am Chromatin sichtbar (Reihe C, Spalte 5). Nach dem Kanu-Stadium werden die Nuklei weiter nadelförmig (Spalte 6).

Der Histon-Protamin Wechsel findet im Kanu-Stadium statt. Zur gleichen Zeit sind Proteine, wie z.B. Tpl^{94D}, in einem Transitionsprotein-Muster exprimiert. Während acetyliertes Histon H4 im runde Nuklei-Stadium kaum detektierbar ist, steigt diese Modifikation bis zum Histonabbau im H-P Wechsel an. Der Wechsel geht ebenfalls einher mit der Einführung von DNA-Strangbrüchen, die erst nach dem Kanu-Stadium langsam verschwinden (Rathke et al., 2007).

1.4 Die Chromatinkondensation durch den Histon-Protamin Wechsel

Die typische, somatische Chromatinorganisation auf Basis von Histonen ermöglicht die sehr variable Verpackung des nukleären Erbguts der Zelle. Dabei sind jeweils 146 bp DNA um ein Oktamer aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden und bilden ein sogenanntes Nukleosom (Luger et al., 1997). Die Nukleosomen-Ketten wiederum können in mehreren Schritten verdreht werden und erreichen damit ein Maximum an Kondensation der Chromosomen während der Mitose (Govin et al., 2004).

In den männlichen Keimzellen vieler Tiere liegt das Genom jedoch noch weitaus stärker kondensiert vor (Lewis et al., 2003). Hier stößt die somatische Chromatinorganisation an ihre Grenzen und wird ersetzt durch eine Struktur auf Basis von Protaminen (Balhorn, 2007). Bei den Säugern werden dazu zunächst die somatischen Histone durch testisspezifische Histonvarianten ersetzt. Diese werden dann übergangsweise durch die kleinen, basischen Transitionsproteine ausgetauscht, bevor schlussendlich die noch kleineren und basischeren Protamine an die DNA angelagert werden (Drabent et al., 1996; Doenecke et al., 1997; Meistrich et al., 2003; Lewis et al., 2003; Govin et al., 2004).

Auch bei *Drosophila* könnte ein dreifach gestaffelter Histon-Protamin Wechsel vorliegen, an dem sowohl Histonvarianten als auch transient eingesetzte Proteine beteiligt sind (Rathke et al., 2007). Bisher konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, deren Expression auf die Transitionsphase zwischen Histonen und Protaminen im Kanu-Stadium beschränkt ist, wie z.B. Tpl^{94D} und Priapos (Rathke et al., 2007, C. Rathke und R. Renkawitz-Pohl pers. Mitteilung). Im Anschluss an den Histonabbau zeigen sich in *Drosophila* die beiden Protamine A und B als die Hauptproteine des Chromatins in den reifenden Spermatiden (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die umfassende Ablösung der Histone von der DNA und ihr anschließender Abbau sind daher zwei der Probleme, die der Mechanismus des H-P Wechsels effizient lösen muss.

Eine weitere Anforderung ergibt sich aus der Protamin-vermittelten Chromatinstruktur. Die Bindung der Säuger-Protamine an die DNA führt zu einer neuen Chromatinstruktur, für die sich das sogenannte Doughnut-Modell durchgesetzt hat (Ward, 1993; Balhorn et al., 2000; Brewer et al., 2003). Nach diesem Modell neutralisieren die Protamine die negativen Ladungen des DNA-Phosphodiester-Rückgrats. Vermittelt durch Van-der-Waals-Kräfte verdichten sich die DNA-Protamin-Komplexe zu toroida-

len Strukturen, den „Doughnut-Loops“. Eine Konsequenz dieses Modells ist, dass die DNA nur noch leicht negativ überdreht ist. Der Abbau von Supercoiling gegenüber der nukleosomalen Struktur stellt eine besondere Anforderung an den molekularen Mechanismus des H-P Wechsels. Das Auftreten von DNA-Strangbrüchen während des H-P Wechsels könnte hier eine Rolle spielen (vgl. 1.4.3 S. 16). Bisher ist unklar, ob die Protamine in *Drosophila*-Spermien zu einer vergleichbaren Chromatinstruktur führen, jedoch zeigt der Ablauf des Histon-Protamin Wechsels in *Drosophila* auffällige Ähnlichkeiten zu den von Säugern bekannten Charakteristika des H-P Wechsels (Rathke et al., 2007; Awe und Renkawitz-Pohl, 2010).

Die evolutive Bedeutung des Histon-Protamin Wechsels ist noch weitgehend ungeklärt. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass eine hydrodynamische Form der Spermienköpfe eine stärkere Kondensation und strukturell rigidere Verpackung des väterlichen Genoms benötigt. Andererseits könnte die protaminbasierte Chromatinstruktur verstärkten Schutz der DNA während des Transfers in den weiblichen Organismus bieten (Torregrosa et al., 2006; Oliva, 2006). Ohne weitere Funktionen auszuschließen, stützen neuere Ergebnisse aus Mutagenesestudien an protamindefizienten *Drosophila*-Spermien die zweite Hypothese (Rathke et al., 2010). Interessanterweise geht jedoch, wie schon erwähnt, der H-P Wechsel sowohl in Säugern als auch in *Drosophila* mit der Einführung von DNA-Strangbrüchen einher (Marcon und Boissonneault, 2004; Rathke et al., 2007). Diese Strangbrüche können selbst Quelle von Mutationen sein, falls die Reparatur der Brüche nicht korrekt erfolgt (McMurray und Kortun, 2003). Um diesen scheinbaren Widerspruch zwischen Schutzfunktion und Mutationsrisiko aufzuklären, ist die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen hinter dem Histon-Protamin Wechsel essentiell. Im Folgenden soll daher ein kurzer Überblick über einige der bisher bekannten Daten zum Ablauf des H-P Wechsels gegeben werden.

1.4.1 Hyperacetyliertes Histon H4 markiert den Beginn des Histon-Protamin Wechsels

Der Histon-Protamin Wechsel beginnt bei Säugern mit der Ablösung der Histone von der DNA. Als mögliches Startsignal für diese Umorganisation wurde die Hyperacetylierung von Histon H4 vorgeschlagen (Braun, 2001; Sassone-Corsi, 2002). Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen und anderen Vertebraten konnte hyperacetyliertes Histon H4 immunhistochemisch in Spermatidenkernen kurz vor der Histonablösung nachgewiesen werden (Hazzouri et al., 2000; Hecht et al., 2009). Im Einvernehmen mit dieser

Hypothese zeigten Sonnack et al. (2002) eine Korrelation von Störungen der menschlichen Spermatogenese mit einem Mangel an acetyliertem Histon H4. Neben Histon H4 liegt in Maus-Spermatiden auch für Histon H3 eine verstärkte Acetylierung zu Beginn des H-P Wechsels vor und wurde mit der Ablösung von Histon H3 in Zusammenhang gebracht (Hazzouri et al., 2000; Nair et al., 2008). Möglicherweise erleichtert die Acetylierung der Histone deren Ablösung, indem die Bindung an die DNA geschwächt und die Chromatinstruktur aufgelockert wird (Görisch et al., 2005). Als weitere Funktion könnten acetylierte Histone durch Vermittlerproteine erkannt werden, welche daraufhin noch nicht bekannte Chromatinremodeller oder Histon-Chaperone an das Chromatin rekrutieren. In diesem Zusammenhang könnte bei Mäusen das testisspezifische Protein BRDT eine wichtige Rolle spielen. Dieses Bromodomänen-tragende Protein ist in der Lage die Kondensation von acetyliertem Chromatin auszulösen (Pivot-Pajot et al., 2003) und wird in frühen Spermatiden exprimiert (Shang et al., 2007). Es bleibt jedoch noch offen, ob und in welcher Weise BRDT tatsächlich im Histon-Protamin Wechsel involviert ist. Die Suche nach weiteren beteiligten Faktoren dauert derzeit an.

Neben den Säugern zeigen auch einige andere Vertebraten und Invertebraten einen Anstieg der Histon H4-Acetylierung vor der Histonablösung (siehe u.a. Oliva und Mezquita, 1982; Kurtz et al., 2007). Zu diesen Tieren zählt auch *Drosophila* (Rathke et al., 2007). Während im runde Nuklei-Stadium nach der Meiose keine H4-Acetylierung nachweisbar ist, taucht diese Modifikation schon im elongierende Nuklei-Stadium erneut auf und verbleibt bis zum Abbau der Histone im frühen Kanu-Stadium (vgl. Abb. 1.2 blauer Balken, S. 12).

1.4.2 Proteasomen-vermittelter Histonabbau

Die umfangreiche Ablösung der Histone von der DNA und ihr nahezu vollständiger Abbau stellen die Spermatiden vor eine große Herausforderung. In menschlichen Spermien werden beinahe 85 % der Histone durch Protamine ersetzt, während bei Mäusen sogar bis zu 99 % möglich sind (Gatewood et al., 1987; Balhorn et al., 1977). Die Situation in *Drosophila* ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnten jedoch auf immunhistochemischem Weg in Spermatiden nach dem H-P Wechsel, bis auf ein Histon-H1-ähnliches Protein (Mst77F), keine Histone mehr nachgewiesen werden (Akhmanova et al., 1997; Rathke et al., 2007, 2010).

Der übliche Weg zum Proteinabbau in den meisten Zelltypen führt über das zelluläre Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Dabei werden Ubiquitin-Ketten über eine Reak-

tionskette von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und Ubiquitin-Ligasen an die abzubauenen Proteine geheftet und diese anschließend im Cytosol vom Proteasom in kleine Peptid-Bruchstücke zerlegt (Übersichtsartikel: Nandi et al., 2006). Selbst nukleäre Proteine werden zumeist in das Cytoplasma ausgeschleust, bevor sie vom Proteasom abgebaut werden. Eine spezielle Form des UPS ist jedoch nukleär lokalisiert und spielt u.a. möglicherweise eine Rolle in der Kontrolle der Kernstruktur und von nukleären Prozessen, wie z.B. der DNA-Reparatur (Übersichtsartikel: Mikecz, 2006). Interessanterweise sind sowohl bei Säugern als auch bei *Drosophila* alle relevanten Komponenten des UPS auch in den Nuklei der Spermatiden vorzufinden (Haraguchi et al., 2007; Zhong und Belote, 2007). Ein Umstand der den Abbau der überschüssigen Histone nach dem H-P Wechsel beschleunigen könnte. *Drosophila*-Spermatiden verfügen dabei sogar über testisspezifische Untereinheiten des Proteasoms und könnten somit eine weitere Optimierung des Histonabbaus erreichen (Übersichtsartikel: Belote und Zhong, 2009). Ein direkter Nachweis, dass die Histone im H-P Wechsel tatsächlich durch das testisspezifische, nukleäre UPS abgebaut werden, fehlt jedoch bisher in allen Modellorganismen.

1.4.3 Transitionsphase und DNA-Strangbrüche

Der Histon-Protamin Wechsel in Säugern ist ein dreistufiger Prozess (Übersichtsartikel: Braun, 2001; Kimmins und Sassone-Corsi, 2005; Carrell et al., 2007). Zunächst wird dabei ein Teil der somatischen Histone durch Histonvarianten substituiert. Anschließend werden die Haupthistone und die Histonvarianten durch Transitionsproteine ersetzt und diese wiederum durch die Protamine ausgetauscht. Transitionsproteine sind klein, basisch und Arginin-reich (Wouters-Tyrou et al., 1998). Mäuse exprimieren zwei Transitionsproteine (TP1 und TP2), die essentiell für die korrekte Spermiogenese sind, wie in Doppelmutanten für TP1 und TP2 gezeigt wurde (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004). Die TPs werden spezifisch während des Histon-Protamin Wechsels exprimiert. Dabei überlappt die Expression der Transitionsproteine sowohl mit den Histonen als auch mit den Protaminen (Meistrich et al., 2003). Hier könnte auch eine der Funktionen der TPs liegen. Die von Histonen weitgehend befreite DNA muss einerseits gebunden und geschützt werden bis die Protamine angelagert wurden. Andererseits könnten diese Proteine die DNA für den Einbau der Protamine vorbereiten (Meistrich et al., 2003). Weiterhin gibt es Hinweise, dass TPs die Reparatur von DNA-Brüchen erleichtern (McPherson und Longo, 1993; Caron et al., 2001).

Die ersten Strangbrüche während des Histon-Protamin Wechsels in Säuger-Spermatiden treten zusammen mit der Ablösung der Histone auf (Marcon und Boissonneault, 2004). Dies führte zu der Annahme, dass die Strangbrüche die Auflösung der negativen Supercoils nach der Entfernung der Nukleosomen erlauben und so die Ausbildung der entspannteren Doughnut-Struktur ermöglichen (Übersichtsartikel: Carrell et al., 2007). Laberge und Boissonneault (2005) zeigten, dass im H-P Wechsel von Maus-Spermatiden vornehmlich Doppelstrangbrüche entstehen und, dass diese im Zusammenhang mit Topoisomerase II-Aktivität stehen. In Kurzzeit-Kulturen von isolierten Spermatiden setzten sie Inhibitoren gegen Histon-Deacetylasen (HDAC) ein, wodurch verfrühte Histon H4-Acetylierung und gleichzeitig auch verfrühte Strangbrüche induziert wurden. Dies war nicht der Fall bei zusätzlicher Gabe von Topoisomerase-Hemmern. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde Topoisomerase IIb-Expression in postmeiotischen Spermatiden immunhistochemisch detektiert (Leduc et al., 2008). Nach Abschluss des H-P Wechsels sind keine DNA-Brüche mehr detektierbar (Marcon und Boissonneault, 2004; Leduc et al., 2008). Eine erfolgreiche Religation bzw. Reparatur der Brüche muss somit stattfinden. Welche Reparatur-Mechanismen in Spermatiden aktiv sind, ist bisher jedoch unbekannt. Durch den haploiden Status des Spermatidengenoms kommen allerdings lediglich rekombinationsunabhängige Mechanismen, wie z.B. nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (*non-homologous end joining* - NHEJ) oder Lücken-Reparatur (*gap repair*) Mechanismen in Frage (Übersichtsartikel: Baarends et al., 2001; Olsen et al., 2005).

In *Drosophila* finden sich ebenfalls transient exprimierte Proteine, welche den H-P Wechsel überbrücken. Das HMG-Box tragende Transition-protein-like^{94D} (Tpl^{94D}) ist nur ein Beispiel dieser Proteine, die jedoch keine strukturelle Ähnlichkeit mit den TPs der Säuger haben (Rathke et al., 2007)(Abb. 1.2 gelber Balken, S. 12). Funktionell könnten sie jedoch eine ähnliche Bedeutung haben und den Einbau der Protamine fördern bzw. die Reparatur von Strangbrüchen erleichtern. DNA-Strangbrüche zeigen sich in Spermatiden von *Drosophila* in geringem Umfang schon im elongierende Nukleinstadium und erreichen ihr Maximum mit der Ablösung der Histone im H-P Wechsel. Im Gegensatz zu Säugern kann man die Brüche jedoch noch relativ lange bis kurz vor der Individualisierung der reifen Spermatiden detektieren (Rathke et al., 2007)(Abb. 1.2 oranger Balken). Bisher ist noch unbekannt welcher Art die Strangbrüche des H-P Wechsels in *Drosophila* sind und ob eine Topoisomerase an der Einführung dieser DNA-Brüche beteiligt ist. Ebenso ist offen, welche DNA-Reparaturmechanismen hier

greifen könnten bzw. ob eine Reparatur schon in den Spermien oder erst in der Zygote stattfindet (siehe auch Abschnitt 5.4, S. 75 in der Diskussion).

1.4.4 Die Anlagerung der Protamine beendet den Histon-Protamin Wechsel

In den Spermien einer ganzen Reihe von Tieren werden die Histone durch Protamine und/oder Protamin-ähnliche Proteine ersetzt (Übersichtsartikel: Hecht, 1989; Ausió, 1999; Lewis et al., 2003). Typische Protamine der Vertebraten sind klein, basisch und stark Arginin-haltig, weisen jedoch keine konservierten Strukturen auf (Lewis et al., 2003, 2004; Balhorn, 2007). Möglicherweise bildet sich erst mit Bindung an die DNA eine definierte Proteinstruktur heraus (Raukas und Mikelsaar, 1999). Die bisher in *Drosophila*-Spermien identifizierten Protamine (ProtA und ProtB) sind ebenfalls klein und basisch, erreichen allerdings nicht den hohen Arginingehalt der Säuger-Protamine (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Interessanterweise tragen sie, wie Tpl^{94D}, eine HMG-Box als strukturelles Motiv (Rathke et al., 2007). In Übereinstimmung mit den Protaminen von Maus und Mensch weisen die *Drosophila*-Protamine Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz auf (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Diese Cysteine ermöglichen intermolekulare Disulfidbrücken, die Teil der toroidalen, protaminbasierten Chromatinstruktur sind, wie sie im Doughnut-Loop Modell der Säuger-Protamine beschrieben sind (Ward, 1993). Es ist allerdings noch unbekannt, ob sich in *Drosophila*-Spermatiden eine vergleichbare Chromatinstruktur ausbildet.

Während die Säuger-Protamine haploinsuffizient und essentiell für die Bildung fertiler Spermien sind (Cho et al., 2001, 2003; Steger et al., 2003), stellten sich protamindefiziente Männchen von *Drosophila* als fertil heraus (Rathke et al., 2010). Möglicherweise sind weitere Protamine oder Protamin-ähnliche Proteine an der Spermiogenese von *Drosophila* beteiligt, so dass es hier zu Redundanzen kommt (C. Rathke und R. Renkawitz-Pohl pers. Mitteilung).

1.5 Arbeitsmodell zum molekularen Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels in *Drosophila melanogaster*

Aus den bisher bekannten Daten zum Histon-Protamin Wechsel während der Spermiogenese von Säugern und *Drosophila* wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein Arbeitsmodell zum molekularen Ablauf des H-P Wechsels erstellt (Abb. 1.3, S. 19).

Nach diesem Modell führt die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs) zu einer verstärkten Acetylierung von Histon H4 und möglicherweise noch weiterer Histone (z.B. H3) (Abb. 1.3 A). Diese Acetylierung öffnet das Chromatin, so dass Bromodomänen-Proteine binden können und Histon-Chaperone und/oder Chromatinremodeller an das Chromatin rekrutiert werden (Abb. 1.3 B). Diese lösen die Histone aus der DNA aus, woraufhin das spezialisierte Ubiquitin-Proteasom-System der Spermatiden mit dem Abbau beginnt (Abb. 1.3 C). Topoisomerase II könnte nun die von den Nukleosomen in der DNA hinterlassenen Supercoils auflösen (Abb. 1.3 D). An dieser Stelle würden DNA-Strangbrüche persistieren, falls die Topoisomerase nicht in der Lage ist die gesetzten Brüche zu religieren. In die entspannte DNA lagern sich die transient exprimierte Proteine (z.B. Tpl^{94D}) ein und erleichtern möglicherweise die Reparatur der nicht-ligierten DNA-Brüche sowie die Einlagerung der Protamine (Abb. 1.3 E). Die Protamine ermöglichen nun die Kondensation des Genoms durch Ausbildung einer neuen Chromatinstruktur, möglicherweise mit Ähnlichkeit zur Doughnut-Struktur der Säuger.

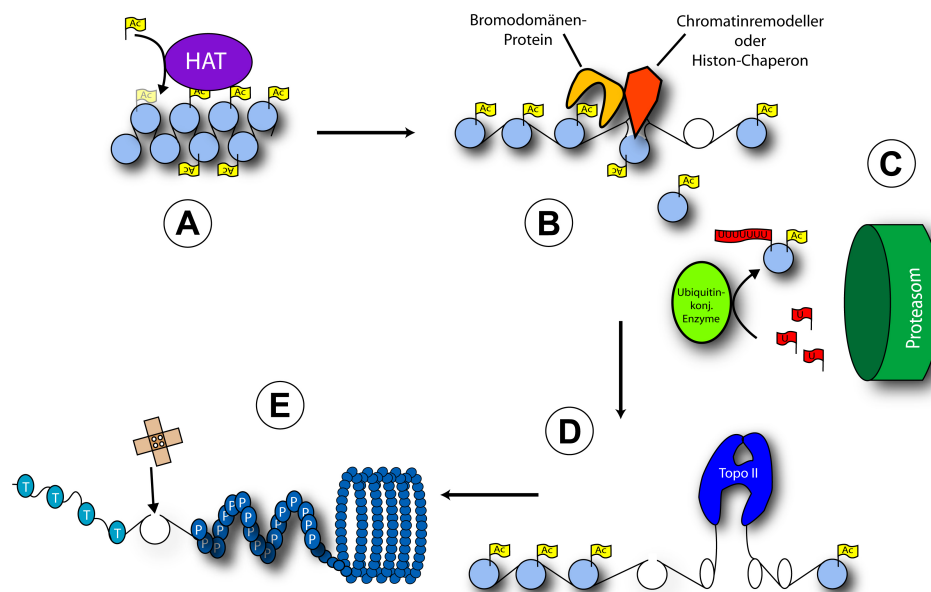


Abbildung 1.3: Arbeitsmodell zum molekularen Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels während der Chromatinkondensation in reifenden Spermatiden von *Drosophila melanogaster*. (A) Anstieg der Histon-Acetylierung durch Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs). (B) Dies wirkt als Startsignal für den Histon-Protamin Wechsel, vermittelt durch Bromodomänen-Proteine, die acetyliertes Histon binden und Chromatinremodeller oder Histon-Chaperone rekrutieren. (C) Die Histone werden von der DNA abgelöst und vermutlich vom Ubiquitin-Proteasom System noch im Nukleus abgebaut. (D) Die freigewordene DNA enthält nach Auflösung der Nukleosomen überschüssige Supercoils, die von Topoisomerase II entspannt werden könnten. Möglicherweise bilden fehlerhafte Topoisomerase-Reaktionen den Ursprung persistierender DNA-Strangbrüche während des H-P Wechsels. (E) Diese Strangbrüche werden repariert (Pflaster), während Tpl^{94D}(T) sowie andere Proteine und schließlich Protamine (P) an der DNA angelagert werden. Die so entstehende protaminbasierte Chromatinstruktur könnte, wie bei Säuger-Spermien, zu einer Doughnut-Struktur der DNA im Spermienkern führen.

1.6 Fragestellung

Wie lange dauert die Chromatinreorganisation von Histonen zu Protaminen und wie verhält sich dieser Zeitrahmen im Vergleich zur gesamten Spermiogenese?

Drosophila teilt mit den Säugern einige charakteristische Merkmale des Histon-Protamin Wechsels in spezifischen Stadien der Spermiogenese. Die Einteilung dieser Stadien beruht in beiden Organismen auf morphologischen Merkmalen der Spermatiden und der Expression von Markerproteinen. In *Drosophila* findet der Histon-Protamin Wechsel im sogenannten Kanu-Stadium statt (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke et al., 2007). Die gleichbleibende Morphologie dieses Stadiums während der Chromatinreorganisation macht es jedoch schwierig den Zeitrahmen des H-P Wechsels in *Drosophila* einzuschätzen. Um diesen Zeitrahmen näher einzugrenzen, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Kultursystem etabliert, mit dem es möglich ist die Entwicklung isolierter Testes und Zysten mit Zeitrafferaufnahmen zu verfolgen. Außerdem wurde eine doppeltransgene Fliegenlinie gekreuzt, die sowohl Histon H2AvD-RFP als auch ProtaminB-eGFP Fusionsproteine exprimiert. Mit Hilfe dieses Stamms wurden Zeitrafferaufnahmen sich entwickelnder, isolierter Zysten sowie des H-P Wechsels in diesen Zysten angefertigt.

Welche Bedeutung haben Histon H4-Acetylierung, DNA-Strangbrüche und das Proteasomsystem für den Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels in *Drosophila*?

Zur Überprüfung des aufgestellten Arbeitsmodells (siehe Abschnitt 1.5, S. 18) zum molekularen Ablauf des Histon-Protamin Wechsels wurde ebenfalls das oben erwähnte Kultursystem eingesetzt. Verschiedene Inhibitoren gegen HATs, HDACs, Topoisomerasen und Proteasom-Aktivität wurden in Kulturen von isolierten, pupalen Testes eingesetzt und der Einfluss auf den H-P Wechsel und die Spermatidenentwicklung geprüft. Diese Methode wurde gewählt, da die betroffenen Proteine und Enzyme zumeist wichtige Funktionen während der vorangehenden Entwicklung der Fliegen und Keimzellen ausüben. Funktionsverlust-Mutanten wären daher in vielen Fällen letal oder würden die Entwicklung von Keimzellen schon prämeiotisch stören.

Welche Histon-Acetyltransferasen sind in Spermatiden von *Drosophila* exprimiert und könnten eine Rolle im H-P Wechsel spielen?

Der Acetylierungsstatus von Histonen (und anderen Proteinen) während der Spermiogenese wird vermutlich vom Verhältnis zwischen Histon-Acetyltransferasen und

Histon-Deacetylasen reguliert (Hazzouri et al., 2000). Sollte sich die gesteigerte Histon-Acetylierung zu Beginn des H-P Wechsels als essentiell am Mechanismus beteiligt herausstellen, stellt sich die Frage nach der verantwortlichen HAT und deren Expressionsmuster in den Spermatiden. In *Drosophila* sind eine ganze Reihe von HATs verschiedener Familien bekannt. Die erst kürzlich publizierte Methode der stadienspezifischen Einzelzysten-RT-PCR (Barreau et al., 2008) wurde in dieser Arbeit angewendet und mit der Eingrenzung möglicher Kandidaten begonnen.

2 Material

2.1 Geräte

Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt der Universität Marburg
Mikroskope	Axioplan mit ApoTome, Zeiss Axiophot, Zeiss Eclipse TE 2000-S, Nikon
Mikroskop-Heiztisch	HT50, MiniTüb
Mikroskop-Kameras	DXM 1200F, Nikon AxioCam ICc1, Zeiss AxioCam MRm, Zeiss
Photometer	Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech
PCR-Automat	Personal Cyclor, Biometra
UV-Geldokumentation	UVsolo, Biometra
Wasserbäder	Haake 5P Haake C1
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Heraeus Univapo 100H, Uniequip Biofuge fresco, Heraeus Biofuge pico, Heraeus

2.2 Chemikalien

Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Serva, Heidelberg

Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe

Weitere allgemeine Chemikalien und Nährmedien wurden in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen: Appligene (Heidelberg), Difco (Eggenstein), Fluka (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

2.3 Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen

PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
PBT	0,1 % Tween 20 in PBS
F-PBS	4 % Paraformaldehyd in PBS

Im nachfolgenden Kapitel werden weitere Puffer, Medien und Lösungen bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.4 Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) und Molekulargewicht-Standards

Trizol [®] -Lösung zur RNA-Extraktion	Invitrogen, Karlsruhe
Mass Ruler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Mass Ruler DNA-Ladder Low Range	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNAqueous [®] -Micro Kit	Ambion, UK
SuperScript [™] III First-Strand	Invitrogen, Karlsruhe
Synthesis SuperMix	

2.5 Antikörper

Anti-Histon H3K9 Acetylierung,
polyklonal aus Kaninchen
Verdünnung: Histologie 1:200

ab4441 - Abcam, UK

Anti-Histon H3K9 Acetylierung,
polyklonal aus Kaninchen
Verdünnung: Histologie 1:1500

H9286 - Sigma, München

Anti-Histon H4R3 Dimethylierung,
polyklonal aus Kaninchen
Verdünnung: Histologie 1:200

07-213 - Millipore, Schwalbach

Anti-Histon H4K5, H4K8, H4K12,
H4K16 Acetylierung,
polyklonal aus Kaninchen
Verdünnung: Histologie 1:200

06-598 - Millipore, Schwalbach

Anti-all histone,
monoklonal aus Maus
Verdünnung: Histologie 1:1200

MAB052 - Millipore, Schwalbach

Anti-Maus Cyanine3 gekoppelt,
IgG aus Ziege
Verdünnung: Histologie 1:300

Dianova, Hamburg

Anti-Maus Cyanine5 gekoppelt,
IgG aus Ziege
Verdünnung: Histologie 1:100

Dianova, Hamburg

Anti-Kaninchen Cyanine3 gekoppelt,
IgG aus Ziege
Verdünnung: Histologie 1:100

Dianova, Hamburg

Anti-Kaninchen Cyanine5 gekoppelt,
IgG aus Ziege
Verdünnung: Histologie 1:100

Dianova, Hamburg

2.6 Enzyme

Axon Taq-DNA-Polymerase

Axon, Kaiserslautern

2.7 *Drosophila melanogaster*-Stämme

<i>CSTM</i>	$w^{-}; \frac{CyO}{Sp}, \frac{MKRS(Sb)}{TM2(Ubx)}$ Multimarkerstamm zur Lokalisation von P-Elementen
<i>white</i>	$w^1, +$ Transformations-Stamm
<i>dProtB-eGFP</i>	Stamm exprimiert Protamin B-eGFP Fusionsprotein; (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005)
<i>H2AvD-RFP</i>	Stamm exprimiert Histon H2AvD-RFP Fusionsprotein; zur Verfügung gestellt von Christian Wenzl (Clarkson und Saint, 1999)
<i>Tpl^{94D}-GFP</i>	Stamm exprimiert transition-protein-like ^{94D} -eGFP Fusionsprotein; zur Verfügung gestellt von Dr. Christina Rathke

2.8 Synthetische Oligonukleotide

Die Primersynthese wurde bei MWG-Biotech, Ebersberg, in Auftrag gegeben.

(34) PCAF-RT-FW	5' GGG TTT CTC CAA GGA CAT CA 3'
(35) PCAF-RT-REV	5' CCC TCC TTG AAG CAA GTC AA 3'
(36) nejire-RT-FW	5' CAT CTC ATG GGT GCC TCT G 3'
(37) nejire-RT-REV	5' GGT ACG ACG CCA CCT CTT T 3'

(40) CG2051-RT-FW	5' CAT CTT GTG GTT CGT GGA TG 3'
(41) CG2051-RT-REV	5' GTA GCC AAG CCG AGT TTC TG 3'
(42) CG1894-RT-FW	5' ATC AGG ACG GGA TAA GTT CG 3'
(43) CG1894-RT-REV	5' CTT CGA TGC ACG ATC CAG TA 3'
(46) CG3927-RT-FW	5' ACC GTG TCT ACT CCA CTG G 3'
(47) CG3927-RT-RV	5' CAT ATC TCG GGT CGC CTG A 3'
(48) CG10252-RT-FW	5' TAC TCT TTC GGC ATG CGC A 3'
(49) CG10252-RT-RV	5' GAC CGG GAC CAT CCT TCT TG 3'

2.9 Software und Internetdatenbanken

Mikroskopische Bilder wurden mit Zeiss AxioVision-Software aufgenommen und mit Adobe Photoshop v. 7.0 bearbeitet. Informationen über das *Drosophila*-Genom wurden der Datenbank FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/> - Tweedie et al., 2009) entnommen. Zur Textverarbeitung wurde L^AT_EX 2_ε verwendet.

3 Methoden

3.1 Versuchstier *Drosophila melanogaster*

3.1.1 Haltung von *Drosophila melanogaster* im Labor

Drosophila melanogaster wurde im Labor in, zu ca. $\frac{1}{4}$ mit Maisgrieß-Nährmedium gefüllten und mit Ceaprenstopfen verschlossenen, Kulturröhrchen gehalten. Es wurden kleine, mittlere und große Kulturröhrchen mit 2,5 cm, 3 cm und 4 cm Durchmesser verwendet. Zur Stimulierung der Eiablage wurde zusätzlich etwas Trockenhefe auf das Nährmedium gestreut. Die Fliegen wurden bei 25°C oder bei 18°C gehalten und je nach Bedarf ungefähr alle zwei Wochen auf frische Kulturröhrchen überführt. Um dies und Kreuzungen etc. zu erleichtern, wurden die Fliegen entweder mit CO₂ oder Diethylether betäubt.

Maisgrieß-Nährmedium:	60 % (w/v) Maisgrieß
	7,15 % (w/v) Fruktose
	1,2 % (w/v) Trockenhefe
	0,14 % (w/v) Nipagin
	0,6 % (v/v) Propionsäure
	0,7 % (w/v) Agar

3.1.2 Kreuzung von *Drosophila melanogaster*-Linien

Zur Verkreuzung von *Drosophila melanogaster* wurden Männchen und jungfräuliche Weibchen in kleinen Kulturröhrchen verpaart. Das Sammeln von jungfräulichen Weibchen wurde durch den Umstand erleichtert, dass *Drosophila melanogaster* Männchen (bei 25°C) erst ungefähr sechs Stunden nach dem Schlüpfen geschlechtsreif werden. Entfernt man also alle geschlüpften Fliegen aus einem Kulturröhrchen, sind alle innerhalb der darauf folgenden sechs Stunden geschlüpften Weibchen Jungfrauen.

3.2 Organkultur von intakten, pupalen *Drosophila*-Testes und Primärkultur von isolierten Zysten

(verändert nach Noguchi und Miller, 2003; Cross und Shellenbarger, 1979)

Kulturen von intakten, pupalen Testes und isolierten Zysten aus *Drosophila*-Testes wurden hergestellt, um die Vorgänge der Chromatinkondensation mit dem Mikroskop in Echtzeit verfolgen zu können. Verwendet wurden transgene Fliegen, die sowohl das Fusionsprotein Histon H2AvD-RFP (*red fluorescent protein*) als auch das Protamin B-eGFP (*green fluorescent protein*) Fusionsprotein exprimierten (H2AvD-RFP Linie zur Verfügung gestellt von Christian Wenzel (Clarkson und Saint, 1999); Protamin-B-eGFP Linie zur Verfügung gestellt von Sunil Jayaramaiah Raja (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005)).

3.2.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente Shields und Sang M3 Insekten-Medium ohne Kaliumbicarbonat (Sigma, Saint Louis, USA)(Shields und Sang, 1977). Diesem wurden Hitzeinaktiviertes, Insektenzellkultur-geeignetes, fetales Rinderserum (Sigma, Saint Louis, USA), Streptomycin und Penicillin G (als Mix bezogen von Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt. Nach Ansatz des Mediums wurde dieses zunächst steril-filtriert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden bei -20°C gelagert. Jedes Aliquot wurde vor Einsatz in der Kultur zunächst über Nacht bei 4°C aufgetaut und dann zwei weitere Male steril-filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen. Dieses filtrierte Medium wurde bei 4°C gelagert und blieb bei steriler Arbeitsweise bis zu zwei Wochen einsatzbereit.

Kulturmedium:	M3 Insektenkulturmedium, pH 6,4±0,3
	10 % (v/v) fetales Rinderserum
	100 µg/ml Streptomycin
	100 U/ml Penicillin G

3.2.2 Organkultur intakter, pupaler Testes von *Drosophila melanogaster*

Zur Kultur von intakten, pupalen Testes aus *Drosophila* wurden ca. zwei Tage alte Puppen seziiert und die Testes isoliert. Dazu wurden Vor-Puppen an der Wand des Kulturröhrchens markiert und nach zwei Tagen mit einer breiten Pinzette in einen Tropfen (ca. 80 μ l) Kulturmedium auf einem sterilen Petrischalendeckel überführt. Mit zwei Dumont No. 5 Pinzetten wurde die Puppenhülle anterior eröffnet und die Hülle bis ungefähr zur Hälfte abgetragen. Die Puppe wurde dann im Thorax- bzw. Kopfbereich großflächig aufgerissen, um den Innendruck der Puppe auszugleichen, ohne die Testes zu beschädigen. Es empfiehlt sich die Puppen anterior zu öffnen, da sonst die Testes im Zuge des Druckausgleichs durch die entstandene Öffnung gedrückt und dabei zuweilen homogenisiert werden. Die Testes liegen zwei Tage nach der Verpupung als bohnenförmige, durchsichtige Organe ohne Anschluss an andere Organe oder den Fettkörper vor (Bodenstein, 1950). Die präparierten Testes wurden mit Hilfe einer Pipette in Kulturschalen mit frischem Medium überführt und bei 25°C in einem lichtdichten Behälter inkubiert.

3.2.3 Kultur intakter Zysten aus *Drosophila melanogaster*-Testes

Zur Kultur intakter, isolierter Zysten wurden zunächst Testes aus Puppen oder adulten Fliegen isoliert und in Kulturmedium in eine Glasbodenschale (MatTek Dishes P35G-1.5-14C, USA) überführt. Die Testishülle wurde mittels feiner Stahlnadeln (Insektennadeln) eröffnet und die austretenden Zysten vorsichtig vereinzelt. Am inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop wurden die zu isolierenden Zystenstadien anhand ihrer Morphologie in der Phasenkontrastoptik sowie der Expression von Histon H2AvD-RFP und ProtaminB-eGFP identifiziert und mit Hilfe der feinen Nadeln von den anderen Zysten abgesondert. Die individuellen Zysten wurden dann, je nach Verwendung der Zysten, mit lang ausgezogenen Glas-Pasteurpipetten in andere Kulturschalen, 24-Well Platten oder Reaktionsgefäße überführt. Es empfiehlt sich dabei die Pipette zunächst mit Medium zu füllen, um einen unkontrollierten Kapillareffekt zu vermeiden, bei dem die Zysten beschädigt werden könnten.

3.2.4 Inhibitorbehandlung von kultivierten Testes und Zysten

Kultivierte Testes und Zysten wurden in 24-Well Platten mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert und ihre Entwicklung beobachtet. Je nach Anwendung wurden einzelne

oder mehrere Testes bzw. Zysten eines Stadiums in 500 μ l Medium in eine Schale einer 24-Well Platte überführt. Anschließend wurden weitere 500 μ l Medium mit dem gewünschten Inhibitor als Vorverdünnung zugegeben. Der Inhibitor wurde so auf die angestrebte Endkonzentration pro Milliliter und Well verdünnt (vgl. Ergebnisteil für Details). Die Testes und Zysten wurden zu Beginn der Kultur und Behandlung am inversen Mikroskop fotografiert und anschließend bei 25°C in einer lichtdichten Kammer inkubiert. Nach Abschluss der Behandlung und Inkubationszeit (meist ca. 24 Stunden) wurden die Präparate erneut fotografiert. Die Testes wurden anschließend einer immunhistologischen Analyse unterzogen und dazu mittels einer Pipette auf Lysinbeschichtete Objektträger übertragen (siehe 3.4.1, S. 35). Kulturen mit den verschiedenen Lösungsmitteln ohne Inhibitoren wurden gesondert durchgeführt und hatten keinen Einfluss auf die Entwicklung der Testes. Die eingesetzten Inhibitoren wurden zu folgenden Stammlösungen verdünnt:

Anacardsäure (Merck)	28,69 mM in DMSO
Camptothecin (Biomol Int.)	2,87 mM in DMSO
InSolution TM Epoxomicin (Merck)	1 mM in DMSO
Etoposid (Merck)	42,5 mM in DMSO
Garcinol (Biolmol Int.)	16,6 mM in DMSO
Trichostatin A (Cell Signalling Tech.)	4 mM in Ethanol

3.2.5 Zeitrafferaufnahmen von isolierten Zysten

Zeitrafferaufnahmen von sich entwickelnden, isolierten Zysten während des Kanu-Stadiums wurden an einem Nikon Eclipse TE 2000-S Invers-Mikroskop mit einem Heiztisch bei 25°C durchgeführt. Nach der Isolation der Zysten in einer Glasboden-Kulturschale wurden einige Zysten aufgrund ihres Entwicklungsstadiums (Histon H2AvD-RFP-Expression bei ausreichender Länge der Flagellen) ausgewählt und die Nuklei im Stundenrhythmus fotografiert. Längere Zeitrafferaufnahmen von Zysten in der Entwicklung über mehrere Stadien hinweg wurden mit jeweils einer isolierten Zyste pro Schale einer 24-Well Platte durchgeführt (vgl. 3.2.3, S. 29). Die Zysten wurden ca. alle 12 Stunden fotografiert und zwischenzeitlich bei 25°C in einer lichtdichten Kammer inkubiert.

3.3 Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren

3.3.1 Extraktion genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

Circa 30 adulte Fliegen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und mit 200 μ l Extraktionspuffer vermischt. Mit Hilfe eines Potters wurden die Fliegen in drei Schritten zermörsert. Nach dem ersten Mörsern wurden weitere 200 μ l Extraktionspuffer zugegeben, nach dem zweiten Mörsern noch einmal 600 μ l. Nachdem alle Fliegen ausreichend zerkleinert waren, wurde das Gefäß für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden zur Proteinfällung 150-200 μ l 8 M Kalium-Acetat-Lösung zugegeben und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Gefäß für 15 min mit 13.000 upm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 μ l Isopropanol (entspricht ungefähr $\frac{1}{2}$ Volumen) zur DNA-Fällung vermischt. Anschließend wurde das Gefäß für 30 min bei 10°C mit 13.000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50 μ l Aqua bidest. resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer:	100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	100 mM EDTA
	100 mM NaCl
	0,5 % (w/v) SDS

3.3.2 Amplifikation definierter DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Nach Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen und kontrolliert synthetisierter Oligonukleotide als Primer.

Die Matrizen-DNA, z.B. genomische DNA oder aus mRNA generierte cDNA, wird im ersten Schritt durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge denaturiert, so dass die Oligonukleotide im zweiten Schritt mit ihrer komplementären Sequenz an der Matrizen-DNA hybridisieren können. An diesem Primer-Matrizen-Hybrid setzt die Polymerase am freien 3'-Ende des Primers zur Synthese des komplementären Stranges zur Matrizen-

DNA an. Durch mehrfachen, konsekutiven Durchlauf von Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation wird die DNA-Sequenz zwischen den gewählten Vorwärts- und Rückwärtsprimern exponentiell amplifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde Axon Taq-DNA Polymerase von Axon Labortechnik, Kaiserslautern, verwendet und ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

PCR-Ansatz:	Matrizen-DNA	5-20 μ l (Endkonzentration 5-100 ng/ μ l)
	Vorwärts-Primer (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
	Rückwärts-Primer (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
	10x BD-Puffer	5 μ l
	MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
	dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	1 μ l
	DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l
	Aqua bidest.	ad 50 μ l
Programm:		
1. Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Hybridisierung	je nach Primer-Paar (z.B. 55°C)	1 min
4. Elongation	72°C	1 min pro 1 kb
30-35 mal Schleife zurück auf 2.		
5. Elongation	72°C	10 min
6. Pause	4°C	∞

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

(Nach Sambrook et al., 1989)

DNA-Moleküle wurden gemäß ihrer Größe elektrophoretisch auf Agarosegelen in TAE- oder TBE-Puffer aufgetrennt. Die Agarosegellkonzentration betrug typischerweise zwischen 1 % und 2 % (w/v) Agarose in 1-fach TAE/TBE und die Elektrophoresespannung zwischen 70 V und 100 V für ca. 20 ml Agarosegel. Zur DNA-Detektion diente Ethidiumbromid mit einer Konzentration von 1 μ g/100 ml Agarosegel.

10x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat (pH 7,7) 100 mM EDTA
10x TBE-Puffer:	1 M Tris 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
10x Ladepuffer:	0,5 % (w/v) Xylencyanol 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin in 1x TAE bzw. TBE

3.3.4 Reverse Transkription von mRNA (RT-PCR)

Zum qualitativen Nachweis der Expression bzw. des Vorhandenseins einer mRNA von Interesse in *Drosophila*-Testes und isolierten Zystenstadien wurden RT-PCRs durchgeführt. Dazu wurde zunächst RNA isoliert und in einem zweiten Schritt auf den darin enthaltenen mRNAs die entsprechenden cDNAs synthetisiert. Im letzten Schritt wurden mittels PCR die gesuchten cDNAs der Transkripte von Interesse amplifiziert und somit qualitativ nachgewiesen.

3.3.4.1 Isolation von RNA aus *Drosophila melanogaster*-Testes

Zur Extraktion von RNA aus *Drosophila*-Testes wurden alle Arbeitsschritte in einer RNase-freien Umgebung mit RNase-freien Arbeitsmitteln durchgeführt. Es wurden ca. 40 Testes in 100 μ l Trizol-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und mit einem Potter in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß homogenisiert. Weitere 900 μ l Trizol wurden zugegeben und der Ansatz für 5 min bei RT mit 13.000 upm zentrifugiert. Anschließend wurden 200 μ l Chloroform zugesetzt und das Reaktionsgefäß 15 sek stark geschüttelt. Es schlossen sich zwei Zentrifugationsschritte an, zunächst bei RT mit 13.000 upm für 3 min, dann bei 4°C mit 13.000 upm für 15 min. In dieser Zentrifugation trennten sich im Gefäß die Phenol-Chloroform-Phase (unten) und die RNA-haltige, wässrige Phase (oben). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ l Isopropanol zur RNA-Fällung vermengt. Dieser Ansatz wurde zunächst bei RT mit 13.000 upm für 10 min und dann für 10 min mit 13.000 upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 75 %-igem Ethanol gewaschen

(Zentrifugation bei 6000 upm und 4°C für 5 min). Die Ethanollösung wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Zum Resuspendieren wurden 25 µl RNase-freies Wasser zugegeben und für 10 min bei 55-60°C erhitzt. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgte bei -20°C.

3.3.4.2 Präparation von RNA aus isolierten Zysten

Zur Gewinnung von RNA aus Zysten wurden zunächst pupale oder adulte Testes von *Drosophila* geöffnet und einzelne Zysten isoliert (siehe auch 3.2.3, S. 29). Das jeweilige Entwicklungsstadium wurde identifiziert und mehrere Zysten eines Stadiums in eine neue Kulturschale transferiert. Diese Schale wurde auf Kontamination mit unerwünschten Stadien geprüft und die Zysten anschließend mit möglichst wenig Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet für jedes Stadium eine frische Glas-Pasteurpipette zu verwenden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die RNA wurde mit Hilfe des RNAqueous Micro Kit (Ambion, UK) nach Herstellerangaben isoliert. Es wurde das Standardprotokoll für geringe Zellmengen aus Zellkultur angewendet. Dabei wurden im ersten Schritt jeweils 100 µl Lyse-Puffer zu den isolierten Zysten in die Reaktionsgefäße gegeben und das schon vorhandene Volumen an Medium vom Übertragen der Zysten vernachlässigt. Am Ende der Aufreinigung wurden 20 µl RNA-Lösung erhalten.

3.3.4.3 cDNA-Synthese an RNA aus Testes und isolierten Zysten

Aus den gewonnenen RNA-Lösungen von ganzen Testes und isolierten Zysten wurde mittels des Superscript III-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) cDNA synthetisiert. Dazu wurden 8 µl RNA-Lösung aus isolierten Zysten bzw. 8 µl einer 1:10 Vorverdünnung der Testis-RNA-Lösung für die cDNA-Synthesereaktion eingesetzt. Dem Standardprotokoll des Herstellers wurde gefolgt und der mitgelieferte Oligo(dT)-Primer verwendet, um gezielt mRNA für die cDNA-Synthese zu verwenden. Es konnten 20 µl cDNA-Lösung je Ansatz erhalten werden.

3.3.4.4 PCR-Amplifikation von cDNAs aus Testes und isolierten Zysten

Zum Nachweis der Expression der Gene von Interesse in Testes bzw. isolierten Zysten wurden Polymerase-Kettenreaktionen (siehe auch 3.3.2 auf S. 31) mit den entsprechenden Oligonukleotiden und 0,5 µl cDNA-Lösung durchgeführt. Der Erhalt von

PCR-Produkt in der jeweils erwarteten Größe ist dabei ein Hinweis auf das Vorhandensein der entsprechenden mRNA bzw. cDNA im Ausgangsmaterial.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Immunhistologische Analysen an Quetschpräparaten von *Drosophila*-Testes

Immunhistologische Analysen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden an Quetschpräparaten von *Drosophila melanogaster*-Testes durchgeführt. Dazu wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet, indem auf jeden Objektträger 10 μ l Poly-L-Lysin-Lösung gegeben wurden und dann dieser Tropfen wie in einem Blutaussstrich mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig verteilt wurde. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet und staubfrei gelagert.

Es wurden je Objektträger ca. sieben Testes in PBS präpariert und in einem kleinen Tropfen PBS auf den beschichteten Objektträgern aufgeklebt. Ein kleines Deckglas (18 \times 18 mm) wurde aufgesetzt und die Flüssigkeit darunter mit einem Stück Whatman-Papier abgesaugt, bis die Testes platzten (im Binokular verfolgt). Um die Präparate zu entwässern und das Deckglas abzulösen, wurden die Objektträger sofort in flüssigen Stickstoff getaucht. Sobald die Siedereaktion aufgehört hatte, wurde das Deckglas mit einer Rasierklinge abgesprengt. Die Objektträger wurden nun sofort bei -20°C in (auf -20°C vorgekühltem) 95 %-igem Ethanol für mind. 10 min (max. wenige Stunden) gelagert, um die Präparate weiter zu entwässern.

Anschließend wurden die Objektträger an Luft leicht getrocknet und dann bei RT für 7 bis 10 min in F-PBS (4 % Formaldehyd in PBS) fixiert. Das F-PBS wurde mit PBS abgespült und die Objektträger bei RT 30 min in PBSTD zur Permeabilisierung inkubiert. Die Präparate wurden dann zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 30 min bei RT in PBT mit 3 % BSA (*bovine serum albumine*) geblockt.

Der Erstantikörper wurde dann in einer entsprechenden Verdünnung in 60 μ l PBT-3 % BSA je Objektträger aufgetragen und mit einem großen Deckglas (24 \times 32 mm) abgedeckt. Die Objektträger wurden in einem feuchten Behälter bei RT für eine Stunde inkubiert.

Die Objektträger wurden anschließend für 15-30 min in PBT-3 % BSA gewaschen und der Zweitantikörper in entsprechender Verdünnung in 60 μ l PBT-3 % BSA auf die Ob-

jektträger gegeben und mit einem großen Deckglas bedeckt. Der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei RT in einem feuchten, lichtdichten Behälter inkubiert.

Die Deckgläser wurden erneut entfernt und die Objektträger in Dunkelheit zunächst 15 min in PBT-3 % BSA gewaschen, dann 20 min mit einer 1:200 Verdünnung von Hoechst (DNA-Farbstoff) in 60 μ l PBT-3 % BSA und einem Deckglas überdeckt und dann erneut 20-30 min in PBT-3 % BSA gewaschen. Die Präparate wurden nun kurz getrocknet und mit Fluoromount-G und einem großen Deckglas eingebettet. Die Lagerung erfolgte in Dunkelheit bei 4°C. Zum Teil wurden Präparate zusätzlich einem TUNEL-Assay unterzogen. Dieser wurde zwischen der Zweitantikörperinkubation und der Hoechstfärbung nach einem 15-minütigen Waschschrift in PBT-3% BSA durchgeführt. Der TUNEL-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (*In situ*- cell death detection kit, TMRred von Roche).

PBSTD:

PBS

0,3 % (v/v) Triton-X 100

0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat

4 Ergebnisse

4.1 Zeitrahmen der Spermiogenese und des Histon-Protamin Wechsels in *Drosophila melanogaster*

Um die Vorgänge und Mechanismen während der Spermienentwicklung zu untersuchen und besser zu verstehen, ist es von Vorteil den zeitlichen Rahmen der Abläufe zu kennen. Der Histon-Protamin Wechsel während der Chromatinkondensation ist ein einmaliger und essentieller Prozess für die Entstehung fertiler Spermien (Carrell et al., 2007). Beim Austausch der Histone durch die Protamine bleiben überdies in Säuger-Spermien sehr spezifische Regionen des haploiden Genoms ausgespart (Hammoud et al., 2009). Dies lässt auf einen komplexen, sehr regulierten Mechanismus schließen. Bisher war jedoch weder für Vertebraten noch für *Drosophila* bekannt wieviel Zeit dieser Wechsel benötigt und wie sich diese Zeitspanne in den Zeitrahmen der Spermiogenese einfügt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst ein Kultursystem etabliert, in dem sich isolierte Testes und Zysten außerhalb der Fliege normal entwickeln. Mit Hilfe dieser Kulturen war es dann möglich, sowohl die Spermiogenese als auch den Histon-Protamin Wechsel in isolierten Zysten von *Drosophila in vivo* zu beobachten.

4.1.1 Keimzellen in isolierten Zysten entwickeln sich in Kultur durch die Meiose und den Histon-Protamin Wechsel

Durch die Analyse der morphologischen Veränderungen der Keimzellen während der Spermatogenese von Vertebraten und auch von *Drosophila* konnten distinkte Entwicklungsstadien beschrieben werden (Übersichtsartikel: Holstein et al., 2003; Fuller, 1993). So ist in *Drosophila* die postmeiotische Entwicklung der Spermatiden unter anderem durch die Bildung des Flagellums sowie die Kernumformung und Chromatinrekonfiguration gekennzeichnet. Anhand dieser Charakteristika lassen sich die Entwicklungs-

stadien in ihrer Abfolge einordnen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Wie schon in der Einleitung (s. Abschn. 1.2, S. 9) ausführlich beschrieben, beginnt die Spermiogenese (postmeiotische Spermienentwicklung) nachdem die 16 primären Spermatozyten einer prämeiotischen Zyste durch die meiotischen Teilungen gegangen sind. Das erste postmeiotische Stadium ist das Nebenkern-Stadium. Charakteristisch sind hier die 64 haploiden Spermatiden mit runden Nuklei, die nur während dieses Stadiums jeweils vom Nebenkern flankiert werden. Im folgenden runde Nuklei-Stadium beginnt die Bildung des Flagellums und die Nuklei werden kleiner. Anschließend elongieren die Nuklei und nehmen eine ellipsoide Form an (elongierende Nuklei-Stadium). Die Kernumformung schreitet voran und die charakteristische Kernform gibt auch dem folgenden Stadium seinen Namen, Kanu-Stadium. In diesem Stadium findet der Histon-Protamin Wechsel statt. Es wird daher unterteilt in frühes Kanu-Stadium mit histonbasiertem Chromatin, und spätes Kanu-Stadium mit protaminbasiertem Chromatin. In der Kernform spiegelt sich dieser Wechsel jedoch nicht wider. Erst im Anschluss setzt sich die weitere Kernumformung zur endgültigen Nadelform der reifen Spermien fort. In Abbildung 4.1 (S. 39) sind die relevanten Stadien der Spermiogenese, wie oben beschrieben, schematisch dargestellt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, individuelle Zysten in ihrer Entwicklung durch die Spermiogenese zu verfolgen und so eine Einschätzung der Verweildauer in den einzelnen Stadien zu ermöglichen. Dazu wurde ein Kultursystem etabliert, in dem sich isolierte Zysten außerhalb des Testis entwickeln können und Zeitrafferaufnahmen mit Hilfe von Lebend-Zell-Mikroskopie möglich sind. Um den Wechsel vom frühen in das späte Kanu-Stadium verfolgen zu können, wurde ein Fliegenstamm verwendet, der sowohl Histon H2AvD-RFP als auch ProtaminB-eGFP (ProtB-eGFP) im jeweils endogenen, natürlichen Muster exprimiert. Der Stamm wurde erstellt durch die Kreuzung eines Stamms, der das Histon H2AvD-RFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des nativen Promotors und der regulatorischen Bereiche exprimiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Wenzl (Clarkson und Saint, 1999)) und eines Stamms, der das ProtaminB-eGFP Fusionsprotein ebenfalls unter der Kontrolle seines nativen Promotors und der regulatorischen Bereiche exprimiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Jayaramaiah Raja (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005)). Das Expressionsmuster der Histonvariante H2AvD während der Spermiogenese steht dabei stellvertretend für alle Haupthistone, wie Rathke et al. (2007) zeigen konnten.

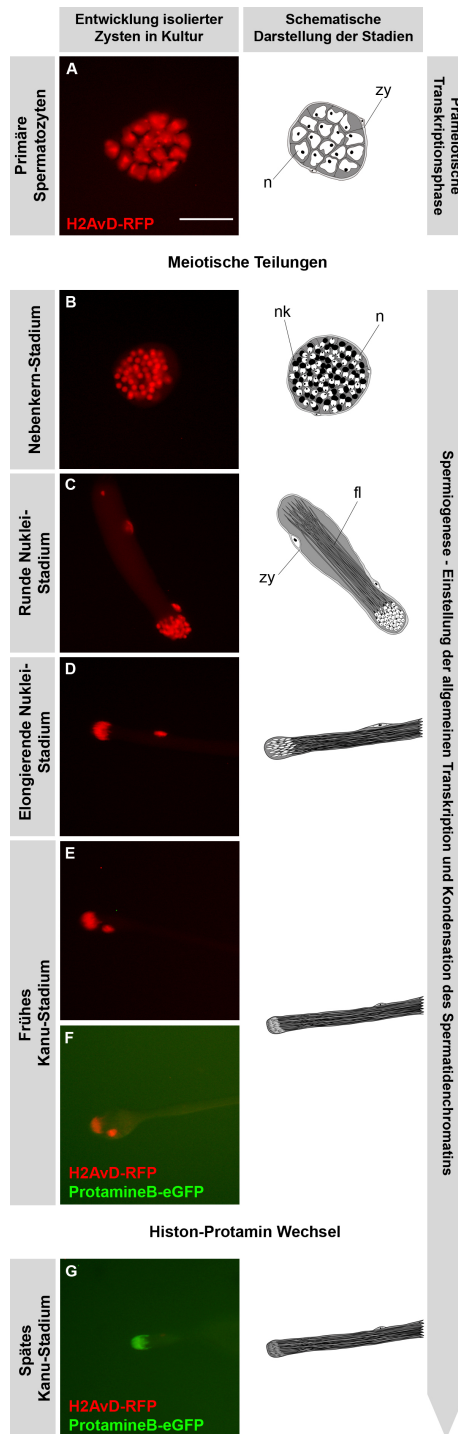


Abbildung 4.1: Keimzellen in isolierten Zysten durchlaufen die Meiose und den Histon-Protamin Wechsel in Kultur.

Zeitrafferserie aus Fluoreszenzmikrographien zweier unabhängiger, isolierter Zysten in Kultur. Zunächst wurden Testes aus Fliegen isoliert, die Histon H2AvD-RFP und ProtaminB-eGFP Fusionsgene enthielten. Aus den Testes wurden Zysten im primären Spermatozyten- (A) und dem runde Nuklei-Stadium (C) gewonnen. Die Entwicklung der Zysten in Kultur wurde bei 25 °C verfolgt. Ein Teil der resultierenden Zeitrafferserie einer primären Spermatocyte (A und B) wird fortgesetzt durch die komplette Serie einer im runde Nuklei-Stadium kultivierten Zyste (C-G). Die zeitliche Auflösung dieser virtuellen Zeitraffer ist ein Bild pro 10 h, beginnend mit dem Ende der meiotischen Teilungen. Die schematischen Zeichnungen neben den Fluoreszenzaufnahmen entsprechen den Zysten-Stadien in der Phasenkontrastoptik. Im Nebenkern-Stadium (B, ca. 10 h nach Teilung) werden die Nuklei (n) von jeweils einem Nebenkern (nk) flankiert und die Spermatiden von zwei somatischen Zysten-Zellen (zy) umschlossen. Im runde Nuklei-Stadium (C, ca. 20 h nach Teilung) sind die Kerne der Keimzellen an einem Ende der Zyste konzentriert, während der Nebenkern entlang des auswachsenden Axonems der Flagellen (fl) elongiert vorliegt. Im elongierende Nuklei-Stadium (D, ca. 30 h nach Teilung) sind die Nuklei ellipsoid und die Flagellen weiter verlängert. Im anschließenden Kanu-Stadium (E-G) verläuft die Kernumformung parallel zur Chromatinreorganisation. Das frühe Kanu-Stadium (E-F) ist ca. 40 h und 50 h nach der Teilung vorzufinden und ist charakterisiert durch histonbasiertes Chromatin mit H2AvD-RFP-Expression. Das späte Kanu-Stadium (G) ist dagegen durch protaminbasiertes Chromatin gekennzeichnet. Maßstab: 50 μ m

Für die Zeitrafferaufnahmen wurden Zysten des primären Spermatozyten-Stadiums und des runde Nuklei-Stadiums aus Testes isoliert und bei 25 °C in Kultur genommen. Die primären Spermatozyten (Abb. 4.1 A) entwickelten sich dabei durch die Meiose bis hin zum elongierende Nuklei-Stadium mit ellipsoider Kernform, welches häufig ca. 30 h nach den meiotischen Teilungen vorzufinden war (ohne Abbildung). Die Kultur-

bedingungen verschlechterten sich jedoch nach ungefähr drei Tagen und die meisten Zysten starben ab. Daher konnte eine Entwicklung der primären Spermatozyten über das elongierende Nuklei-Stadium hinaus nicht beobachtet werden. Zysten, die im runden Nuklei-Stadium kultiviert wurden (Abb. 4.1 C), entwickelten sich dagegen über das elongierende Nuklei-Stadium hinaus bis nach dem Abschluss des Histon-Protamin Wechsels zwischen frühem und spätem Kanu-Stadium (Abb. 4.1 E-G). Die Abbildung 4.1 besteht daher aus einem Teil der Zeitrafferserie einer Zyste mit primären Spermatozyten (Abb. 4.1 A-B) und der kompletten Serie von einer Zyste, die im runden Nuklei-Stadium kultiviert wurde (Abb. 4.1 C-G). Die zeitliche Auflösung dieser virtuellen Zeitrafferaufnahme ist ein Bild pro ca. 10 h ab den meiotischen Teilungen. Interessanterweise erscheinen die Keimzellen dabei länger im frühen Kanu-Stadium zu verweilen als in den vorangehenden postmeiotischen Stadien (ca. 20 h, Abb. 4.1 E und F). Anschließend entwickeln sich die Zysten durch den Histon-Protamin Wechsel, so dass ca. 60 h nach den meiotischen Teilungen ein klares ProtaminB-eGFP Signal in den Nuklei zu erkennen ist (Abb. 4.1 G).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Keimzellen in isolierten Zysten in Kultur die gleichen Entwicklungsstadien durchlaufen und den Histon-Protamin Wechsel vollziehen, wie es aus intakten Fliegen bekannt ist. Das Kanu-Stadium scheint dabei mit 20-30 h von längerer Dauer zu sein als andere Stadien der Spermiogenese. Es stellt sich die Frage, welchen Zeitraum der Wechsel von den Histonen zu den Protaminen innerhalb dieses Stadiums beansprucht.

4.1.2 Innerhalb von fünf Stunden wechselt das Chromatin in kultivierten Spermatiden von einer histonbasierten zu einer protaminbasierten Struktur

Während der Chromatinkondensation in sich entwickelnden Spermatiden von *Drosophila* werden die Histone von der DNA entfernt und abgebaut. An ihre Stelle treten die Protamine, mit deren Hilfe eine weitaus stärkere Kondensation des väterlichen Genoms erreicht wird als mit einer nukleosomalen Chromatinstruktur. In *Drosophila* findet dieser Histon-Protamin Wechsel innerhalb des sogenannten Kanu-Stadiums statt. Zeitrafferaufnahmen von kultivierten, isolierten Zysten zeigen, dass sich das Kanu-Stadium insgesamt über 20-30 h erstreckt (siehe 4.1.1, S. 37). Die Dauer des Histon-Protamin

Wechsels während dieses Stadiums wurde nun mit größerer zeitlicher Auflösung untersucht. Dazu wurden Zysten des frühen Kanu-Stadiums aus Testes von H2AvD-RFP- und ProtB-eGFP-exprimierenden Fliegen isoliert und auf dem Heiztisch eines inversen Mikroskops bei 25 °C in Kultur genommen. Individuelle Zysten mit klarem H2AvD-RFP Signal, typischer Kernform des Kanu-Stadiums sowie möglichst weit elongierten Flagellen wurden ausgewählt und Zeitrafferaufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von einem Bild pro Stunde angefertigt (Abb. 4.2, S. 41). Zu Beginn der Aufnahmen ist lediglich das H2AvD-RFP Signal in den Nuklei zu erkennen (Pfeile in Abb. 4.2 Reihe a). Dieses Signal wird anschließend schwächer, während gleichzeitig ein Anstieg des ProtB-eGFP Signals zu verzeichnen ist. Nach ungefähr 5 h in Kultur ist H2AvD-RFP nicht mehr detektierbar und die Nuklei sind deutlich mit ProtB-eGFP assoziiert (Abb. 4.2 Reihe f). Interessanterweise kann nach ca. 2-3 h eine Überlappung von H2AvD-RFP und ProtB-eGFP mit jeweils schwacher Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 4.2 Reihen c und d).

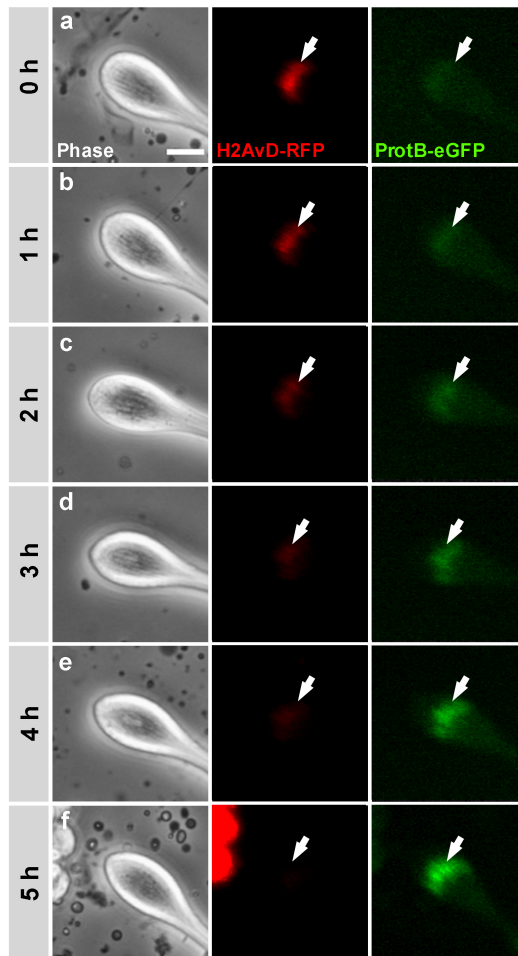


Abbildung 4.2: Der Histon-Protamin Wechsel benötigt ca. 5 h in Spermatidenkernen von isolierten Zysten in Kultur. Zeitrafferserie von Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer isolierten Zyste in Kultur. Aus Testes von H2AvD-RFP- und ProtaminB-eGFP-exprimierenden Fliegen wurden einzelne Zysten des Kanu-Stadiums isoliert und deren individuelle Entwicklung durch den Histon-Protamin Wechsel in Kultur bei 25 °C mit Zeitrafferaufnahmen verfolgt. Zu Beginn der Serie ist das Chromatin der Nuklei vornehmlich mit Histonen assoziiert (H2AvD-RFP Signal in Reihe a; Pfeile markieren die Nuklei). ProtaminB-eGFP ist noch nicht detektierbar. Im Verlauf des Wechsels nimmt das H2AvD-RFP Signal ab, während die Expression von ProtaminB-eGFP zunimmt. Nach ca. 5 h ist das Chromatin der Spermatiden deutlich mit Protaminen assoziiert und das Histon-Signal nahezu vollständig verschwunden (Reihe f). Bei ca. 2-3 h (Reihen c und d) liegt eine Überlappung der Expression von Histonen und Protaminen mit jeweils nur schwacher Fluoreszenzintensität vor. Maßstab 15 µm

In isolierten, bei 25 °C kultivierten Zysten läuft der Histon-Protamin Wechsel innerhalb von ca. 5 h ab und nimmt somit lediglich einen Zeitraum von ungefähr einem Fünftel des Kanu-Stadiums ein. Während dieser Zeit findet eine kurze Phase mit schwacher, gleichzeitiger Expression von Histonen und Protaminen statt.

4.2 Bedeutung der Histon-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel

In einigen Vertebraten, vor allem den Säugern, wird die Spermiogenese bis zum Histon-Protamin Wechsel von posttranslationalen Modifikationen der Histone begleitet. Unter anderem findet sich ein starker Anstieg der Acetylierung von Histon H4 vor dem Beginn des Histonabbaus (siehe u.a. Oliva und Mezquita, 1982; Hazzouri et al., 2000; Govin et al., 2007; Hecht et al., 2009). Die derzeitigen Modelle zum Mechanismus des H-P Wechsels gehen dabei von einer dualen Funktion dieser Modifikation aus (Braun, 2001; Govin et al., 2004). Zunächst könnte die Histon H4-Acetylierung die Öffnung des Chromatins bewirken, um die anschließende Ablösung der Histone und den Einbau der nachfolgenden Proteine zu erleichtern. Dabei könnte es unterstützt werden durch die Acetylierung anderer Histone, wie z.B. Histon H3-Acetylierung an Lysin 9. Diese Modifikation wird ebenfalls zu Beginn des Wechsels verstärkt detektiert und ihr Fehlen führt zu einer längeren Verweildauer des H3 am Chromatin der Spermatiden (Nair et al., 2008). Als zweite Funktion wird angenommen, dass das acetylierte Histon H4 als eine Art Startsignal für den Beginn des H-P Wechsels dient, indem möglicherweise Bromodomänenproteine an modifizierte Histone binden und dann weitere Faktoren für den Ablauf des H-P Wechsels rekrutieren (Shang et al., 2007). Eine Untersuchung der Vorgänge bei Mangel an H4-Acetylierung (bzw. generellem Acetylierungsmangel) wurde im Säugermodell bisher jedoch noch nicht unternommen.

Seit einiger Zeit ist auch für *Drosophila* bekannt, dass Histon H4-Acetylierung im Vorfeld des H-P Wechsels akkumuliert (Rathke et al., 2007). Bisher war nicht bekannt, ob auch in *Drosophila*-Spermatiden die Acetylierung von Histon H3K9 eine Rolle spielt. Um diesen Aspekt zu klären, wurden zunächst Quetschpräparate von adulten Testes aus H2AvD-RFP- und ProtB-eGFP-exprimierenden Fliegen (siehe auch 4.1.1, S. 38) hergestellt. Das Auftreten von acetyliertem H3K9 im Vergleich zur Acetylierung von H4 während der Spermatogenese wurde anschließend mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 4.3, S. 43). Während die Acetylierung von Histon H4 an den Lysinen K5, K8,

K12 oder K16 in primären Spermatozyten deutlich zu detektieren ist, fällt das Signal im postmeiotischen runde Nuklei-Stadium drastisch ab (Abb. 4.3 C, Spalten 1 und 2). Schon im elongierende Nuklei-Stadium steigt die Acetylierung wieder stark an und persistiert bis zum Abbau der Histone im frühen Kanu-Stadium (Abb. 4.3 C, Spalten 3 und 4). Im Gegensatz zur Acetylierung von Histon H4 ist an K9 acetyliertes Histon H3 nur in den Nuklei primärer Spermatozyten, also prämeiotisch, zu beobachten (Abb. 4.3 F, Spalte 1). Postmeiotisch geht die Acetylierung von H3K9 auf ein kaum nachweisbares Maß zurück (Abb. 4.3 F, Spalten 2-5). Dieses Muster bestätigte sich auch bei der Verwendung eines weiteren, unabhängigen Antikörpers gegen acetyliertes H3K9 (ohne Abbildung).

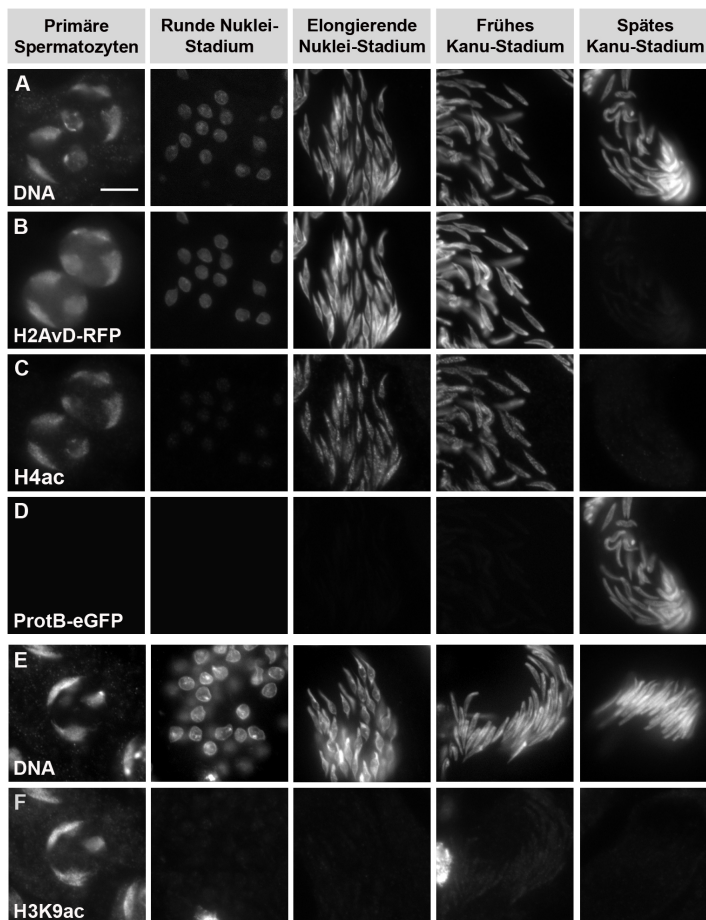


Abbildung 4.3: Histon H4-Acetylierung findet in elongierenden Nuklei nach der Meiose statt, während H3K9-Acetylierung postmeiotisch nicht mehr zu detektieren ist. Quetschpräparate von Spermatidennuklei aus adulten Testes von H2AvD-RFP- und ProtB-eGFP-exprimierenden Fliegen. DNA wurde gefärbt mit Hoechst (Reihe A und E). Die Histonverteilung wird repräsentiert durch H2AvD-RFP (Reihe B) und zeigt den Abbau der Histone nach dem frühen Kanu-Stadium (Spalten 4-5). Die Protamine werden im späten Kanu-Stadium in das Chromatin eingebaut (Reihe D, Spalte 5). Histon H4-Acetylierung wurde immunhistochemisch nachgewiesen mit einem Antikörper gegen H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac und H4K16ac (Reihe C). Die Acetylierung von H4 nimmt postmeiotisch im runde Nuklei-Stadium stark ab (Reihe C, Spalte 2), steigt dann jedoch im elongierende Nuklei-Stadium wieder an und persistiert bis zum Histonabbau (Reihe C, Spalten 3-4). Dagegen ist Acetylierung von Histon H3K9 in postmeiotischen Stadien immunhistochemisch kaum noch detektierbar (Reihe F). Maßstab 10 µm

Der sehr geringe Level an Histon H3-Acetylierung in postmeiotischen Stadien weist möglicherweise darauf hin, dass der Acetylierung von Histon H4 in *Drosophila* eine besondere Rolle während der Spermiogenese zukommt. Es liegt somit nahe auch in *Dro-*

sophila ein Modell aufzustellen, in dem die H4-Acetylierung ein Startsignal darstellt und den Histon-Protamin Wechsel einleitet. Gleichzeitig müsste in diesem Fall vermutet werden, dass Histon-Acetyltransferasen (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen (HDAC) einen essentiellen Einfluss auf das Acetylierungsmuster und damit auf den Histon-Protamin Wechsel ausüben. Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit getestet. Die klassische Verfahrensweise der Untersuchung von Funktionsverlustmutanten konnte hier jedoch nicht angewendet werden, da einerseits eine ganze Reihe HATs und HDACs in *Drosophila* zu verzeichnen sind (vgl. auch Tab. 4.1, S. 56) und andererseits deren Expression zumeist nicht auf den Testis beschränkt ist. Somit wäre mit einer Vielzahl von embryonal- bis larval-letalen Effekten zu rechnen und eine Untersuchung des Histon-Protamin Wechsels nicht möglich. Der Einsatz von Inhibitoren gegen HATs und HDACs in Kulturen isolierter Testes bzw. Zysten könnte dabei eine effiziente Alternative sein, um den generellen Einfluss dieser Enzymklassen auf den Histon-Protamin Wechsel zu überprüfen.

Der Einsatz isolierter Zysten für Inhibitorstudien erwies sich als unpraktikabel, um größere Ansätze zu bearbeiten bzw. Vorversuche zur Ermittlung der angemessenen Inhibitorkonzentration durchzuführen. In adulten, intakten Testes ist es andererseits aufgrund der Vielzahl der verschiedenen vorhandenen Stadien nicht möglich das Schicksal einzelner Zysten zu verfolgen. Allerdings ist bekannt, dass die erste meiotische Teilung während der Puppenbildung stattfindet (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005). Daher wurde überprüft, zu welchem Zeitpunkt nach der Puppenbildung die ersten ProtaminB-eGFP-positiven Zysten auftreten. Ca. 48 h nach Puppenbildung wurden ProtB-eGFP-exprimierende Zysten in pupalen Testes detektiert (ohne Abbildung). In Testes ca. 24 h nach Puppenbildung war dagegen noch kein Protamin-Signal zu beobachten, obwohl alle prä- und postmeiotischen Stadien bis zum Histon-Protamin Wechsel vorhanden sind (Abb. 4.4A, S. 46). Nach Inkubation dieser Testes in Kultur für 24 h wurden auch hier ProtB-eGFP-exprimierende Zysten beobachtet (Abb. 4.4A'). Folglich findet der Histon-Protamin Wechsel der ersten Zysten zwischen 24 und 48 h nach Puppenbildung statt. Nützlicherweise liegen pupale Testes in diesem Stadium noch als birnenförmige Organe ohne Verbindung zum Fettkörper oder zu den somatischen Strukturen des Fortpflanzungsapparates (z.B. Paragonien oder *vas deferens*) vor. Sie weisen außerdem noch keine Pigmentierung auf und die Testishülle ist nur sehr dünn (Bodenstein, 1950). Dies erleichtert die Isolation der Testes aus Puppen und den Zugang der Inhibitoren zu den Spermatiden innerhalb des Testis. Die Inhibitorstudien

wurden zunächst in Kulturen solcher intakten, pupalen Testes durchgeführt. Nach Isolation der Testes aus ca. 24 h alten Puppen wurden die Testes auf Abwesenheit von ProtaminB-eGFP Signal überprüft, anschließend mit Inhibitor für 24 h bei 25 °C inkubiert und erneut auf ProtaminB-eGFP Signal untersucht. Diese Versuche wurden mehrfach wiederholt mit jeweils 8 Testes pro Inhibitor und Ansatz.

4.2.1 Anacardsäure (AA), aber nicht Trichostatin A (TSA), verhindert den Wechsel zu protaminbasiertem Chromatin in pupalen Testes

Dem Histon-Protamin Wechsel geht ein Anstieg der Acetylierung von Histon H4 voran, der als Vorbedingung oder Startsignal vorgeschlagen wurde (Braun, 2001). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Inhibitoren gegen HATs und HDACs in Kulturen von pupalen Testes eingesetzt. So sollte der Level an Acetylierung in den Spermatidennuklei beeinflusst und die Auswirkungen auf den H-P Wechsel beobachtet werden (Abb. 4.4, S. 46). Zur Senkung des Acetylierungslevels wurde der Histon-Acetyltransferase-Inhibitor Anacardsäure (AA) verwendet. Die niedermolekulare Verbindung wird aus Cashewnussschalen gewonnen und wirkt inhibierend auf HATs der p300- und PCAF-Familien (Balasubramanyam et al., 2003). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass auch Tip60, eine HAT der MYST-Familie, durch AA inhibiert wird. Anacardsäure wird daher als genereller Inhibitor der HAT-Aktivität *in vitro* und *in vivo* betrachtet (Sun et al., 2006). Um im Gegenzug die Acetylierung zu verstärken, wurde Trichostatin A (TSA) als HDAC-Inhibitor verwendet. TSA ist ein vielfach eingesetzter Inhibitor von Histon-Deacetylasen, der ursprünglich aus Pilzen isoliert wurde (Mai et al., 2005). Sowohl HDACs der Klasse I als auch HDACs der Klasse II werden durch TSA inhibiert (Mehnert und Kelly, 2007).

Aus H2AvD-RFP- und ProtaminB-eGFP-exprimierenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) wurden Testes isoliert und in Kultur entweder mit 150 μ M AA (Abb. 4.4 B, B') oder mit 5 bzw. 50 μ M TSA (Abb. 4.4 C, C' bzw. D, D') inkubiert. Zu Beginn der Behandlung sind in keinem der Testes ProtaminB-eGFP-positive Zysten zu beobachten (Abb. 4.4 A-D). Nach ca. 24 h Inkubation haben sowohl in den unbehandelten Kontrolltestes (Abb. 4.4 A') als auch in den TSA-behandelten Testes (Abb. 4.4 C'-D') die ersten Zysten den Histon-Protamin Wechsel durchlaufen. Dies ist nicht der Fall in den mit AA behandelten Testes, deren Zysten weiterhin H2AvD-RFP exprimieren, jedoch ohne Protamin-Signal bleiben (Abb. 4.4 B'). Auch die Expression eines GFP-Fusionsproteins des transient, während des H-P Wechsels exprimierten Proteins Tpl^{94D} kann nach AA-Behandlung nicht mehr beobachtet werden (Abb. 4.5 B, B').

Die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen scheint somit tatsächlich eine wichtige Rolle für den Histon-Protamin Wechsel zu spielen, während die Aktivität von Histon-Deacetylasen vernachlässigt werden kann. Die Inhibition von HDACs scheint keinen Einfluss auf den Abschluss des H-P Wechsels zu haben, wobei nicht klar ist, ob sich der zeitliche Ablauf verändert.

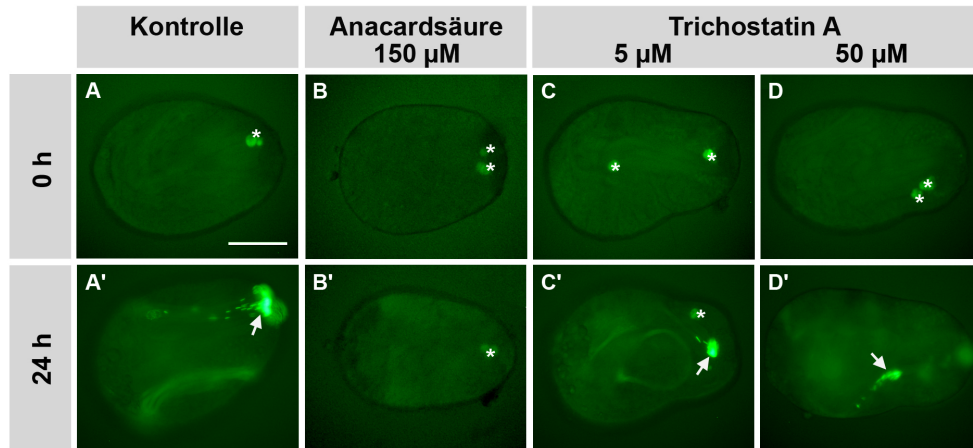


Abbildung 4.4: Anacardsäure (AA), aber nicht Trichostatin A (TSA), inhibiert den Histon-Protamin Wechsel in intakten, pupalen Testes in Kultur. Testes aus *protaminB-eGFP* tragenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) wurden für 24 h in Medium ohne Inhibitor (A, A') und in Medium mit entweder 150 μ M AA (B, B') oder mit 5 bzw. 50 μ M TSA (C, C' bzw. D, D') inkubiert. Zu Beginn der Kultur sind keine ProtaminB-eGFP-positiven Zysten zu erkennen (A-D). Nach 24 h Inkubation treten jedoch Zysten mit ProtaminB-eGFP Signal (Pfeile) in den Kontrolltestes (A') und den mit dem HDAC-Inhibitor TSA behandelten Testes (C', D') auf. Im Gegensatz dazu zeigen die mit dem HAT-Inhibitor AA behandelten Zysten keine ProtaminB-eGFP-positiven Zysten (B'). * = putative Fettkörperzellen mit Eigenfluoreszenz; Maßstab 100 μ m

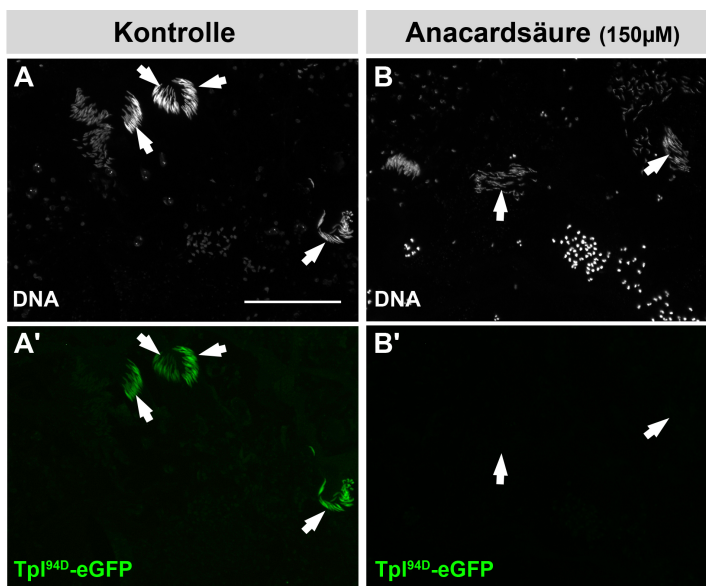


Abbildung 4.5: Die Expression des Tpi^{94D}-eGFP Fusionsproteins ist in mit Anacardsäure (AA)-behandelten pupalen Testes nicht detektierbar. Übersichtsaufnahmen aus Quetschpräparaten von pupalen Testes. DNA wurde mit Hoechst angefärbt (A, B). Aus Tpi^{94D}-eGFP-exprimierenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) wurden Testes isoliert und entweder in Medium ohne Inhibitor (A, A') oder in Medium mit 150 μ M Anacardsäure (B, B') für 24 h inkubiert. In den Kontrolltestes sind Tpi^{94D}-eGFP-positiven Zysten zu erkennen (A', Pfeile). In AA-behandelten Testes ist dagegen kein Tpi^{94D}-eGFP detektierbar (B', Pfeile deuten auf die ältesten, identifizierbaren Nuklei). Maßstab 100 μ m

4.2.2 Anacardsäure verhindert die Acetylierung von Histon H4, während Trichostatin A verfrühte H4-Acetylierung auslöst

In Kulturen intakter, pupaler Testes konnte der HAT-Inhibitor Anacardsäure (AA) das Auftreten von ProtB-eGFP-positiven Zysten verhindern, während der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) keinen solchen Effekt zeigte. Der Einfluss der beiden Inhibitoren auf den Acetylierungsstatus von Histon H4 in den Spermatidennuklei wurde nun immunhistologisch in Quetschpräparaten behandelter Testes überprüft.

Im Gegensatz zu den Spermatiden in Kontrolltestes (Abb. 4.6 Reihe B) zeigen Spermatidennuklei aus AA-behandelten ($150\text{ }\mu\text{M}$) Testes kein Histon H4-Acetylierungssignal (Abb. 4.6 Reihe E). Gleichzeitig bleibt jedoch das Muster der Dimethylierung an Arginin 3 des Histon H4 auch nach AA-Behandlung unverändert erhalten (Abb. 4.6 Reihen C und F). Dies weist darauf hin, dass AA tatsächlich einen negativen Einfluss auf die Acetylierung von Histon H4 ausübt, während andere posttranslationale Modifikationen und die Konzentration des Histon H4 selbst nicht betroffen sind. Weiterhin erscheint das Chromatin der AA-behandelten Nuklei stark kondensiert im Vergleich zu den Kontrollnuklei, wie besonders im runde Nuklei- und elongierende Nuklei-Stadium zu erkennen ist (Abb. 4.6 Reihe D, Spalten 2-3). Obwohl nach AA-Behandlung ein Spermatozytennukleus über einen größeren Bereich gespreitet ist als vergleichbare Kontrollnuklei (Abb. 4.6 vgl. Reihe A und D, Spalte 1), erscheinen die drei großen Chromosomen-domänen im Nukleus doch stärker kondensiert als in der Kontrolle. Die Expression von Tpl^{94D}-eGFP (vgl. Abb. 4.5) und ProtaminB-eGFP (ohne Abbildung) konnte auch in den Quetschpräparaten der behandelten Testes nicht beobachtet werden. Die Acetylierung von Histonen ist somit offensichtlich essentiell, um die Entwicklung von *Drosophila*-Spermatiden von einer histonbasierten zu einer protaminbasierten Chromatinstruktur zu ermöglichen.

Die Behandlung pupaler Testes mit Trichostatin A sollte zu einem Anstieg der Histon-Acetylierung in allen Keimzellnuklei mit HDAC-Aktivität führen. Tatsächlich zeigt sich in primären Spermatozyten aus TSA-behandelten ($50\text{ }\mu\text{M}$) Testes eine Verstärkung des Histon H4-Acetylierungssignals (Abb. 4.6 Reihe H, Spalte 1) sowie eine aufgelockerte Chromatinstruktur (Abb. 4.6 Reihe G, Spalte 1). Interessanterweise ist im runde Nuklei-Stadium ein Histon H4-Acetylierungssignal zu beobachten, das in den Kontrollnuklei so nicht vorliegt (vgl. Abb. 4.6 Reihen B und H, Spalte 2). Dieses Signal entspricht somit einer TSA-vermittelten, verfrühten Histon H4-Acetylierung in einem frühen postmeiotischen Stadium. Überraschenderweise nimmt der Einfluss von TSA in

Anacardsäure verhindert die Acetylierung von Histon H4 und führt zu einer Kondensation des Chromatins ohne Beteiligung von Tpl^{94D} oder Protaminen. Während die Aktivität der Histon-Acetyltransferasen von essentieller Bedeutung für die Entwicklung ProtB-eGFP-positiver Spermatiden ist, verhindert die Blockade von Histon-Deacetylasen durch TSA die Entwicklung dieser Zysten nicht. Vielmehr führt die HDAC-Inhibition zu einer verfrühten Histon H4-Acetylierung im runde Nuklei-Stadium.

4.2.3 Anacardsäure-bedingter Mangel an Histon-Acetylierung führt zu Entwicklungsstopp isolierter Zysten, während TSA-induzierte Histon-Acetylierung die weitere Entwicklung nicht verhindert

In Quetschpräparaten von Inhibitor-behandelten, pupalen Testes zeigen sowohl Anacardsäure als auch Trichostatin A einen deutlichen Einfluss auf die Acetylierung von Histon H4. Während AA diese Modifikation blockiert, wird sie durch TSA-Behandlung verstärkt und verfrüht ausgelöst. Allerdings zeigen nur die AA-behandelten Testes keine ProtaminB-eGFP-positiven Zysten. Dies könnte zum einen direkt auf eine Beteiligung am Histon-Protamin Wechsel, zum anderen aber auch auf eine Entwicklungsblockade der Zysten zurückzuführen sein. In Kulturen isolierter Zysten wurde dieser Zusammenhang überprüft (Abb. 4.7, S. 50). Zunächst wurden Zysten im runde Nuklei-Stadium aus Testes mit Expression von H2AvD-RFP und ProtB-eGFP isoliert und in Kultur genommen. Bei Inkubation ohne Inhibitor für ca. 20 h gingen fast alle Zysten in das elongierende Nuklei-Stadium über (17 von 18) (Abb. 4.7 A). Im Gegensatz dazu entwickelten sich nach AA-Behandlung (150 μ M) keine der Zysten weiter (0 von 13). Auch hier führt Anacardsäure zu einer Kondensation des Chromatins und zu einer Verkleinerung der Kernform (Abb. 4.7 B). Eine Behandlung mit TSA hat lediglich Einfluss auf die Form und das Wachstum der beiden somatischen Zystenzellen, während sich die Spermatidennuklei zu einem elongierten Nuklei-Stadium weiterentwickeln (Abb. 4.7 C und D). Die meisten der mit 50 μ M TSA behandelten Zysten (7 von 13) und nahezu alle der mit 5 μ M TSA behandelten Zysten (13 von 14) konnten sich in das nächste Nuklei-Stadium entwickeln. Keine der behandelten Zysten zeigte eine Veränderung in der Signalstärke des H2AvD-RFP. Folglich scheint die TSA-vermittelte, verfrühte Histon H4-Acetylierung nicht mit einem verfrühten Histonabbau einherzugehen. Weiterhin ist in diesen Zysten keine vorzeitige Translation von ProtaminB-eGFP zu beobachten (ohne Abbildung). Die Entwicklung von primären Spermatozyten durch die Meiose wurde sowohl von AA als auch von TSA blockiert (ohne Abbildung).

Der von Anacardsäure vermittelte Acetylierungsmangel führt zu einem Entwicklungsstopp der Spermatiden, während TSA die weitere Entwicklung ermöglicht. Allerdings führt die TSA-vermittelte, verfrühte H4-Acetylierung nicht zu einem verfrühten Histon-Protamin Wechsel, da kein verfrühter Histonabbau bzw. vorzeitige Translation von Protaminen beobachtet wurde.

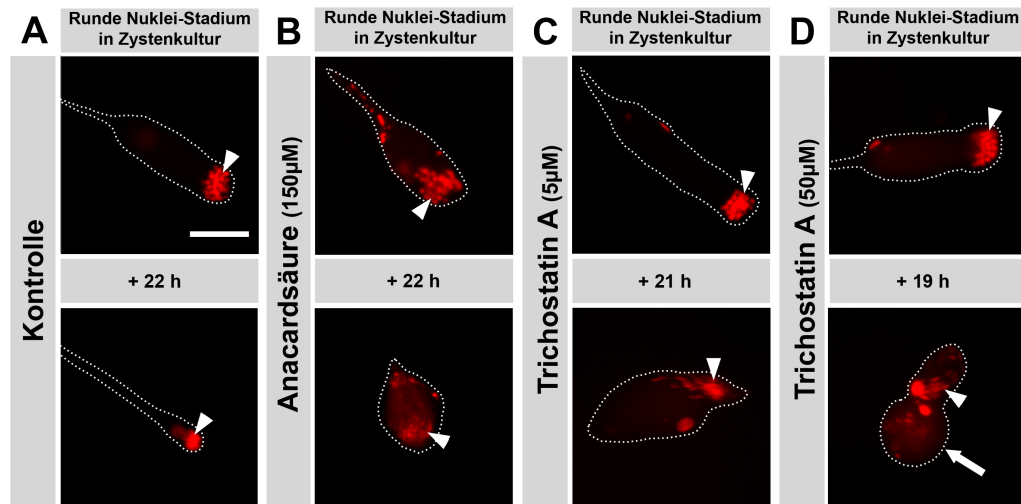


Abbildung 4.7: Behandlung mit Anacardsäure (AA) blockiert die Entwicklung von isolierten Zysten in Kultur, wohingegen Trichostatin A (TSA) die Entwicklung von runden Spermatidennuklei in ein elongiertes Stadium erlaubt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von isolierten Zysten in Kultur. Die Form der Zysten ist durch gestrichelte Linien markiert. Zysten des runden Nuklei-Stadiums wurden aus H2AvD-RFP-exprimierenden pupalen Testes isoliert und für ca. 20 h entweder ohne Inhibitor (A) oder mit 150 μ M AA (B) oder mit 5 bzw. 50 μ M TSA (C bzw. D) inkubiert. Während sich Kontrollzysten vom runden Nuklei-Stadium zum späten elongierende Nuklei-Stadium (A, Pfeilköpfe) weiterentwickeln, ist dies nicht der Fall bei AA-behandelten Zysten (B). AA blockiert die weitere Entwicklung und die Nuklei werden kompakt und sehr klein (B, Pfeilköpfe). Nach TSA-Behandlung entwickeln sich die runden Nuklei weiter zu elongierten Nuklei-Stadien (C, D). TSA scheint jedoch einen Einfluss auf die Form und das Wachstum der somatischen Zysten-Zellen zu haben (Pfeil in D). Maßstab 50 μ m

4.2.4 TSA-vermittelte, verfrühte Acetylierung von Histonen induziert keine verfrühten DNA-Strangbrüche

Nach Behandlung intakter, pupaler Testes mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A in Kultur weisen schon Nuklei des frühen, postmeiotischen runden Nuklei-Stadiums eine gesteigerte Histon H4-Acetylierung auf. Diese verfrühte Acetylierung führt jedoch nicht zu einem vorzeitigen Histonabbau. Ein weiteres Zeichen des einsetzenden Histon-Protamin Wechsels in unbehandelten Zysten ist die Induktion von DNA-Strangbrüchen, die ihr Maximum im Histon-Protamin Wechsel erreichen und anschließend wieder abnehmend detektiert werden (Rathke et al., 2007). Das möglicherweise verfrühte Auftreten dieses

Merkmals in TSA-behandelten, pupalen Testes wurde mittels TUNEL-Reaktion (engl. *terminal-dUTP-nick end labelling*) in Quetschpräparaten überprüft (Abb. 4.8, S. 51). Bei der TUNEL-Reaktion werden Fluorophor-gekoppelte dUTP-Nukleotide von einer Terminalen-dUTP-Transferase an freie 3'OH-Enden gebrochener DNA angehängt und auf diese Weise sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche für die Fluoreszenzmikroskopie markiert.

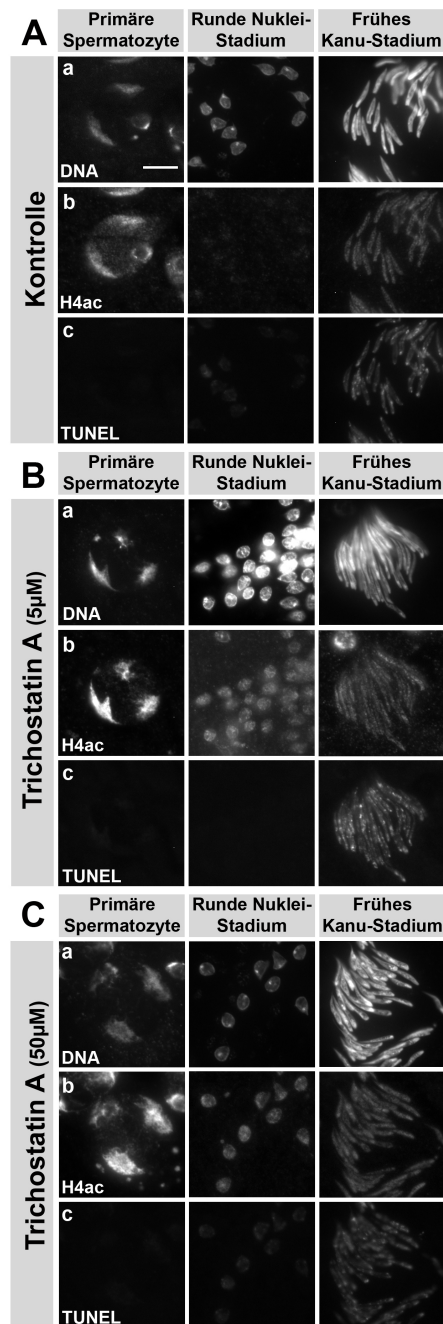


Abbildung 4.8: TSA-induzierte, verfrühte Histon H4-Acetylierung führt nicht zu verfrühter Induktion von DNA-Strangbrüchen. Quetschpräparate von Spermatidennuklei aus pupalen Testes nach Inkubation entweder ohne Inhibitor (A) oder mit $5\mu\text{M}$ TSA (B) bzw. $50\mu\text{M}$ TSA (C). DNA wurde mit Hoechst angefärbt (jeweils Reihe a) und Histon H4-Acetylierung wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (jeweils Reihe b). DNA-Strangbrüche wurden durch TUNEL-Reaktion sichtbar gemacht (jeweils Reihe c). Behandlung von pupalen Testes mit dem HDAC-Inhibitor TSA induziert einen Anstieg der H4-Acetylierung in den Nuklei des runde Nuklei-Stadiums, der so nicht in Kontrollnuklei zu finden ist (vgl. Ab, Spalte 2 mit Bb und Cb, Spalte 2). Allerdings geht dies nicht mit einem Anstieg des TUNEL-Signals in den entsprechenden Stadien einher (vgl. Ac mit Bc und Cc). Maßstab $10\mu\text{m}$

Zunächst wurden Testes aus H2AvD-RFP und ProtB-eGFP tragenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) isoliert und entweder ohne Inhibitor (Abb. 4.8 A) oder mit 5 bzw. 50 μ M TSA für 24 h inkubiert (Abb. 4.8 B und C). Anschließend wurden Quetschpräparate angefertigt und Histon H4-Acetylierung (immunhistochemisch) sowie Strangbrüche (TUNEL) nachgewiesen. In TSA-behandelten Testes ist deutlich die verfrühte Histon H4-Acetylierung im runde Nuklei-Stadium zu erkennen, die in der Kontrolle nicht zu verzeichnen ist (Abb. 4.8 vgl. Reihe b, Spalte 2 in A, B und C). Gleichzeitig ist jedoch kein signifikant verstärktes TUNEL-Signal in den behandelten Nuklei detektierbar (Abb. 4.8 vgl. Reihe c, Spalte 2 in A, B und C). Das Muster der mittels TUNEL-Reaktion markierten DNA-Strangbrüche bleibt nach TSA-Behandlung unverändert gegenüber den Kontrolltestes (Abb. 4.8 Reihe c in A, B und C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TSA-vermittelte, verfrühte Acetylierung von Histon H4 keinen vorzeitigen Beginn des Histon-Protamin Wechsels auslöst, da dessen typische Merkmale, DNA-Strangbrüche und Histonabbau, nicht vorzeitig beobachtet werden konnten.

4.2.5 Die von Anacardsäure ausgelöste Chromatinkondensation und Entwicklungsblockade ist nicht auf zytotoxische Nebenwirkungen zurückzuführen

Die Behandlung von intakten, pupalen Testes und isolierten Zysten mit dem HAT-Inhibitor Anacardsäure hat einen negativen Einfluss auf die Histon H4-Acetylierung. Außerdem führt sie zu einer Kondensation des Spermatidenchromatins und einer Entwicklungsblockade. Die Überlegung liegt nahe, dass diese Effekte nicht durch die Blockade von Histon-Acetyltransferasen ausgelöst werden, sondern auf zytotoxische Nebenwirkungen des Inhibitors oder auf eine ausgelöste Apoptose zurückgehen. Sollte dies der Fall sein, dürften sich diese Effekte nicht in AA-behandelten Zellen zeigen, die kein HAT-Substrat mehr aufweisen, also keine Histone mehr besitzen. Späte postmeiotische Spermatiden während des Histonabbaus im Histon-Protamin Wechsel müssten somit resistent gegen AA-Behandlung sein und sich weiter differenzieren.

Zur Prüfung dieser Überlegungen wurden pupale Testes in einem Stadium isoliert, in dem sich nur eine ProtaminB-eGFP-positive Zyste pro Testis beobachten ließ (Abb. 4.9 A, S. 54). Diese einzelne Zyste deutete darauf hin, dass sich gleichzeitig eine Reihe

weiterer Zysten direkt im Histon-Protamin Wechsel bzw. dem Histonabbau befanden. Nach Inkubation der Testes ohne Zugabe von Inhibitoren für ca. 11 h entwickelten sich weitere ProtB-eGFP-positive Zysten, die somit den Histon-Protamin Wechsel abschließen und sich weiter differenzieren konnten (Abb. 4.9 A, Reihe a). Dies war gleichermaßen der Fall nach Behandlung der Testes mit Anacardsäure ($150\text{ }\mu\text{M}$) (Abb. 4.9 A, Reihe b). Ein weiterer bekannter HAT-Inhibitor ist Garcinol, welcher HATs der p300- und PCAF-Familien inhibiert (Balasubramanyam et al., 2004). Im Gegensatz zur Behandlung mit AA zeigte sich keine weitere Differenzierung der Zysten im H-P Wechsel wenn Garcinol ($50\text{ }\mu\text{M}$) zu den Testes gegeben wurde (Abb. 4.9 A, Reihe c).

Im Einzelnen wiesen 73,9 % der 23 AA-behandelten Testes nach 11 h weitere ProtB-eGFP-positive Zysten auf. Dies erreichten ebenfalls 95,7 % der 23 Kontrolltestes ohne Inhibitor, aber nur 13,6 % der 22 Garcinol-behandelten Testes (Abb. 4.9 B). Folglich scheint die beobachtete AA-vermittelte Entwicklungsblockade in frühen postmeiotischen Spermatidenstadien nicht auf einen Nebeneffekt des Inhibitors zurückzugehen, sondern kann vermutlich auf die HAT-inhibierende Wirkung zurückgeführt werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Behandlung mit Anacardsäure Apoptose und apoptotische DNA-Degradation auslöst. Um dies zu überprüfen, wurde das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in Keimzellnuklei AA-behandelter Testes mittels TUNEL-Reaktion in Quetschpräparaten getestet (Abb. 4.9 C). In den Nuklei primärer Spermatozyten kann weder in den Kontrolltestes, noch in den mit AA ($150\text{ }\mu\text{M}$) behandelten Testes ein TUNEL-Signal detektiert werden (Abb. 4.9 C, a' und c'). Auch im frühen Kanu-Stadium führt Anacardsäure nicht zu einem erkennbaren Anstieg des TUNEL-Signals verglichen mit Kontrollnuklei (Abb. 4.9 C, vgl. b' mit d'). Eine Beteiligung apoptotischer Vorgänge an der Chromatinkondensation nach AA-Behandlung scheint somit unwahrscheinlich.

Sowohl der chromatinkondensierende Effekt als auch die Entwicklungsblockade in Spermatiden nach Anacardsäurebehandlung scheint nicht auf Nebeneffekte, sondern auf die Inhibition von Histon-Acetyltransferasen zurückzugehen. Während also die Acetylierung von Histonen durch Histon-Acetyltransferasen essentiell für die Entwicklung der reifenden Spermatiden ist, scheint ein Verlust von HDAC-Aktivität weniger störend auf die Zellen einzuwirken. Vielmehr wird durch HDAC-Inhibition eine verfrühte Histon-Acetylierung induziert, ohne jedoch einen vorzeitigen Histon-Protamin Wechsel auszulösen. Das Zusammenspiel der HAT- und HDAC-Konzentrationen in Spermatiden-

nuklei könnte also eine besondere Rolle in der Entwicklung reifer, fertiler Spermien von *Drosophila* spielen.

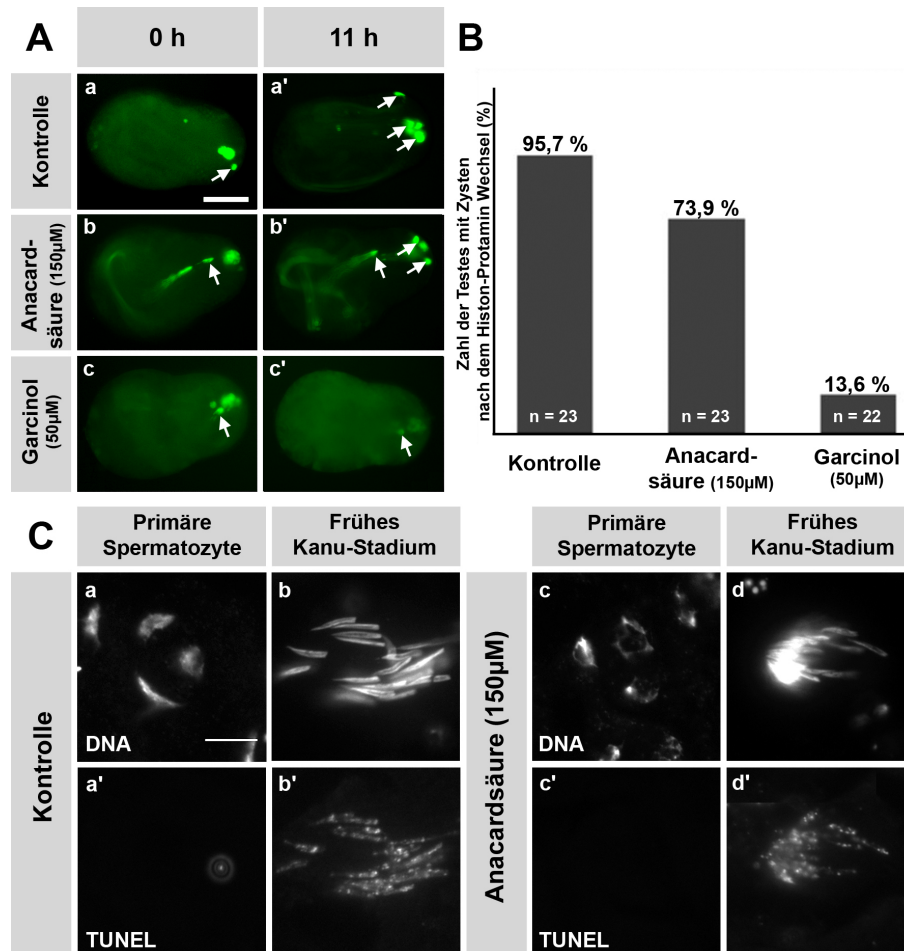


Abbildung 4.9: Der Effekt von Anacardsäure (AA) auf den Histon-Protamin Wechsel und das Spermatiden-Chromatin ist nicht auf Zytotoxizität oder Apoptose zurückzuführen. (A) Pupale Testes mit einer einzelnen ProtaminB-eGFP-positiven Zyste wurden 11 h lang entweder ohne Inhibitor (A, a und a') oder mit 150 µM AA bzw. mit 50 µM Garcinol inkubiert. Die Zahl der ProtaminB-eGFP-exprimierenden Zysten (Pfeile) steigt in den Kontrolltestes an (A, a'). Ein solcher Anstieg ist ebenfalls bei den AA-behandelten Testes zu beobachten (A, b'). Dementgegen lässt die Behandlung mit einem anderen HAT-Inhibitor, Garcinol, keine weitere Entwicklung von Zysten nach dem Histon-Protamin Wechsel zu (A, c'). (B) Von 23 pupalen Testes in der Kontrollkultur entwickelten 95,7 % weitere ProtB-eGFP-positive Zysten nach 11 h Inkubation. Dies war ebenso zu beobachten bei 73,9 % der 23 pupalen Testes in der AA-behandelten Kultur. Jedoch konnten nur in 13,6 % der 22 Garcinol-behandelten pupalen Testes weitere ProtB-eGFP-positive Zysten verzeichnet werden. (C) Quetschpräparate von pupalen Testes nach 24 h Inkubation entweder ohne Inhibitor (C, a und b) oder mit 150 µM AA (C, c und d). DNA wurde gefärbt mit Hoechst (C, a-d) und DNA-Strangbrüche wurden visualisiert mittels TUNEL-Reaktion (C, a'-d'). Spermatozyten aus AA-behandelten Testes zeigen die AA-induzierte Chromatinkondensation (C, c), jedoch keinen Anstieg des TUNEL-Signals (C, c' vgl. a'). Das TUNEL-Signal in Nuklei des frühen Kanu-Stadiums ist ebenfalls nicht verstärkt gegenüber der Kontrolle (C, d' vgl. b'). Maßstab in A = 100 µm und C = 10 µm

4.2.6 Expression von Histon-Acetyltransferasen im Histon-Protamin

Wechsel von *Drosophila*-Spermatiden

Die Inhibition von Histon-Acetyltransferasen in pupalen Testes und die dadurch ausgelösten Effekte auf die Chromatinverteilung und die Entwicklung der Spermatiden deuten auf eine essentielle Bedeutung dieser Enzyme für die Spermatidenreifung und den Histon-Protamin Wechsel hin. Bisher ist unklar, welche HATs aus welchen Familien in Spermatiden von *Drosophila* exprimiert und aktiv sind. In *Drosophila* sind eine ganze Reihe von HATs bekannt (Tab. 4.1). Für einige dieser Enzyme ist eine im Testis hochregulierte Expression annotiert worden (vgl. Tab. 4.1, Daten entstammen der Datenbank FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007)), ihre zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster innerhalb des Testis sind jedoch oft noch unbekannt.

Eine HAT aus der MYST-Familie, Mof (*males absent on the first*), deren Homolog postmeiotisch in Spermatiden der Maus exprimiert ist (Thomas et al., 2007), wurde ebenfalls als interessanter Kandidat für die *Drosophila*-Spermatogenese angesehen, obwohl hier keine Hochregulation vorliegt. Die Expression von Mof wurde daher immunhistologisch in Quetschpräparaten überprüft. Mof konnte jedoch nur prämeiotisch detektiert werden (ohne Abbildung). Um unter den weiteren HATs mögliche Kandidaten zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit begonnen mit einer stadienspezifischen Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) nach HATs mit Expression in postmeiotischen Stadien zu suchen. Dazu wurden Zysten aus Testes isoliert und nach Stadien entsprechend ihrer Morphologie und Expression von H2AvD-RFP bzw. ProtB-eGFP sortiert. Aus jeweils ca. 4-6 einzelnen Zysten eines Stadiums wurde dann RNA isoliert. Zusätzlich wurde RNA aus vollständigen Testes isoliert. Die mRNA der Proben wurde mittels Oligo-dT-Primer revers in cDNA transkribiert. Die cDNA einiger HAT-Gene wurde anschließend mittels PCR detektiert, wobei die Primer zu beiden Seiten ein Intron einrahmten und so PCR-Produkte mit DNA- bzw. RNA-Ursprung unterschieden werden konnten. Die Transkripte der Gene *CG3927* und *CG10252* dienten als Kontrolle. Während *CG3927* nur in prämeiotischen Stadien exprimiert wird, ist mRNA von *CG10252* auch bis in sehr späte, postmeiotische Spermatiden vorzufinden (Barreau et al., 2008). Die RT-PCR auf den Transkripten dieser Gene diente somit einerseits der Kontrolle der isolierten postmeiotischen RNA auf eine Kontamination mit prämeiotischen Stadien und andererseits als Positiv-Kontrolle für die Isolation der RNA aller Stadien und der anschließenden Amplifikation der cDNA-Fragmente (Abb. 4.10 A, S. 57).

Tabelle 4.1: Tabelle der FlyBase-notierten Histon-Acetyltransferasen von *Drosophila*. Die Acetyltransferasen entstammen zum größten Teil der GNAT-Superfamilie mit Ähnlichkeit zu *Gcn5* und *PCAF*. Die Hoch- (↑) bzw. Abwärtsregulation (↓) der Expression im Testis laut FlyAtlas ist angegeben. (o = ohne Veränderung)

Name	Familie	Expressionsregulation in Testis laut FlyAtlas	Anmerkung
nej	p300/CBP	↓	in Zysten-RTPCR getestet
mof	MYST	o	in Immunfluoreszenz getestet
chm	MYST	o	
enok	MYST	↓	
CG1849	MYST	↑↑	in Zysten-RTPCR getestet
Tip60	MYST	↓	
Dat	GNAT	↓	
PCAF	GNAT	↓	in Zysten-RTPCR getestet
san	GNAT	o	
CG15766	GNAT	↓↓	
Nat1	GNAT	↓	
CG14222	GNAT	↓	mögl. Elternngen zu CG31730
Elp2	GNAT	↓	
CG15628	GNAT	↓	
CG9486	GNAT	↓	
CG12560	GNAT	↓	
CG17681	GNAT	↓	
CG15155	GNAT	↓↓	
CG5783	GNAT	↓	
CG10414	GNAT	↓	
eco	GNAT	↓	
CG18177	GNAT	↓	
Ard1	GNAT	↓	
CG8481	GNAT	↓	
CG4210	GNAT	↓	
CG7593	GNAT	o	
CG1969	GNAT	↓	
CG11539	GNAT	↑	kein Intron
CG31730	GNAT	↑↑↑	kein Intron; Tochter zu CG14222
CG31851	GNAT	↑↑	kein Intron
CG32319	GNAT	↑↑↑	kein Intron
dik	nicht bekannt	↓	
YL-1	nicht bekannt	o	
CG2051	nicht bekannt	↑	in Zysten-RTPCR getestet
Rpb4	nicht bekannt	↓	
CG1994	nicht bekannt	↓	
CG11412	nicht bekannt	↓	

Wie erwartet ist für *CG3927* (Primerpaar 46/47) ein PCR-Produkt mit RNA-Ursprung (270 bp) lediglich in primären Spermatozyten und in Testes zu beobachten (Abb. 4.10 A). PCR-Produkt von *CG10252*-cDNA (Primerpaar 48/49, 268 bp) konnte dagegen aus den Proben aller Stadien amplifiziert werden. Folglich sind die verwendeten postmeiotischen cDNA-Proben kontaminationsfrei und enthalten ausreichend Material, um spezifische cDNAs nachzuweisen. In gleicher Weise wurde die Expression von CG1894 (MYST-Familie), Nejire (p300/CBP-Familie), PCAF (GNAT-Superfamilie) und CG2051 (ohne zugeordnete Familie) überprüft (Abb. 4.10 B). Lediglich *CG2051* und *PCAF* zeigten dabei prä- und postmeiotische Expression. *CG2051* ist bis in die Stadien der elongierenden und der frühen Kanu-Nuklei detektierbar (Abb. 4.10 A und B, EL-FK). *PCAF*-Transkript kann bis ins runde Nuklei-Stadium nachgewiesen wer-

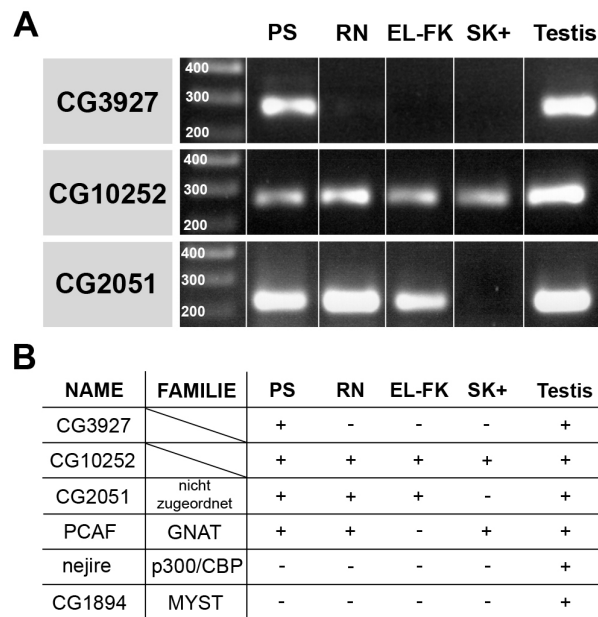


Abbildung 4.10: Die Transkripte der Histon-Acetyltransferasen (HATs) *CG2051* und *PCAF* können postmeiotisch mittels stadienspezifischer RT-PCR nachgewiesen werden. Aus Testes von H2AvD-RFP- und ProtB-eGFP-exprimierenden Fliegen wurden Zysten präpariert und in Kultur genommen. RNA wurde isoliert aus jeweils zwischen vier und sechs Zysten der vier Kategorien: primäre Spermatozyten (PS), runde Nuklei-Stadium (RN), elongierende Nuklei- bis frühes Kanu-Stadium (mit H2AvD-RFP Signal) (EL-FK) sowie spätes Kanu-Stadium und älter (mit ProtB-eGFP Signal) (SK+). Zusätzlich wurde RNA aus vollständigen Testes isoliert (Testis). Von der mRNA der fünf Proben wurde cDNA revers transkribiert und mittels PCR detektiert. (A) PCR-Analyse der Kontrolltranskripte CG3927 und CG10252 sowie der HAT CG2051. Bei CG3927 ist ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (270 bp für RNA-Ursprung) in primären Spermatozyten und in Testis-RNA zu finden. Das PCR-Produkt für CG10252 (268 bp für RNA-Bande) ist dagegen in allen getesteten Stadien und Testis-RNA zu beobachten. Dies stimmt mit den publizierten Expressionsmustern überein (Barreau et al., 2008). Für CG2051 wurde ein PCR-Produkt (234 bp) postmeiotisch bis in das frühe Kanu-Stadium erhalten. (B) Expressionsmuster von vier HATs ermittelt durch eine stadienspezifische RT-PCR. *CG2051*: siehe oben. *PCAF*-mRNA ist bis ins runde Nuklei-Stadium zu finden. Danach ist sie nicht mehr detektierbar, tritt aber erneut im spätes Kanu-Stadium nach ProtB-eGFP-Expression auf. Sowohl *nejire* als auch *CG1894* sind nicht in den getesteten Keimbahnzellen exprimiert. Lediglich in der Testis-RNA sind ihre Transkripte nachweisbar.

den, nimmt dann jedoch ab und ist wieder in Spermatiden des spätes Kanu-Stadiums bzw. älteren Stadien zu detektieren (vgl. Tabelle in Abb. 4.10 B). Die Transkripte der HATs *Nejire* und *CG1894* sind dagegen nur in der Probe aus Gesamttestis nachzuweisen und wären demnach nicht in den getesteten Stadien der sich entwickelnden Keimzellen von *Drosophila* exprimiert (vgl. Tabelle in Abb. 4.10 B). Diese PCR-Analyse wurde bisher nur einmal durchgeführt und das Ergebnis sollte daher verifiziert werden. Für einige interessante HATs der GNAT-Superfamilie, mit im Testis besonders hochregulierter Transkription, konnte diese RT-PCR-Methode leider nicht angewandt werden, da diese Gene keine Introns aufweisen und somit keine Kontrolle auf einen möglichen DNA-Ursprung eines PCR-Produktes möglich ist (vgl. Tab. 4.1).

In diesen ersten Versuchen konnten die Transkripte der HATs PCAF und CG2051 in postmeiotischen Stadien nachgewiesen werden. Sie stellen daher mögliche Kandidaten für eine Rolle in der Spermiogenese von *Drosophila* dar, deren Expressionsmuster weiter zu verifizieren ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell der stadienspezifische Nachweis von Transkripten durch Isolation von RNA aus wenigen Zysten mit anschließender nicht-quantitativer RT-PCR möglich ist.

4.3 Inhibition des Proteasoms durch Epoxomycin verhindert das Auftreten von Protamin-exprimierenden Spermatiden

Während der Reifung der Spermatiden von Säugern und auch *Drosophila* erfahren die männlichen Keimzellen grundlegende, zelluläre Umgestaltungen, die mit dem Abbau großer Mengen an Proteinen einhergehen (Carrell et al., 2007; Renkawitz-Pohl et al., 2005). Auch der Histon-Protamin Wechsel in den reifenden Nuklei gehört zu diesen Prozessen. Beim Menschen wird das Chromatin zu über 80% von den Histonen befreit und durch Protamine gebunden (Gatewood et al., 1987). In *Drosophila* besteht die Möglichkeit, dass die Histone vollständig abgelöst werden, obgleich weitere Studien notwendig sind, um dies zu klären (Rathke et al., 2007). In beiden Fällen müssen große Mengen von Histonen und anderen Proteinen während des Histon-Protamin Wechsels abgebaut werden. Der Hauptweg für den kontrollierten Proteinabbau in Eukaryoten ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Glickman und Ciechanover, 2002), dessen Bestandteile sowohl in den Spermatidennuklei der Säuger als auch von *Drosophila* nachgewiesen wurden (Haraguchi et al., 2007; Belote und Zhong, 2009). Daher wird davon ausgegangen, dass die Histone in reifenden Spermatiden durch das UPS abgebaut werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese durch Inhibitorstudien in Kulturen pupaler Testes von *Drosophila* überprüft werden. Die Inhibition des Proteasoms wurde dabei durch Epoxomycin erreicht. Epoxomycin wird aus Actinomyceten gewonnen und ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als sehr spezifischer, irreversibler Proteasom-Inhibitor bekannt (Meng et al., 1999). Es wurden Testes aus H2AvD-RFP- und ProtB-eGFP-exprimierenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) isoliert und mit 0,5 μ M Epoxomycin kultiviert (Abb. 4.11, S. 59). Nach Inkubation für ca. 23 h bei 25 °C zeigten Kontrolltestes ohne Inhibitorbehandlung das Auftreten von ProtB-eGFP-positiven Zysten (in 14 von 14 Testes) (Abb. 4.11 A, b), während keiner der mit

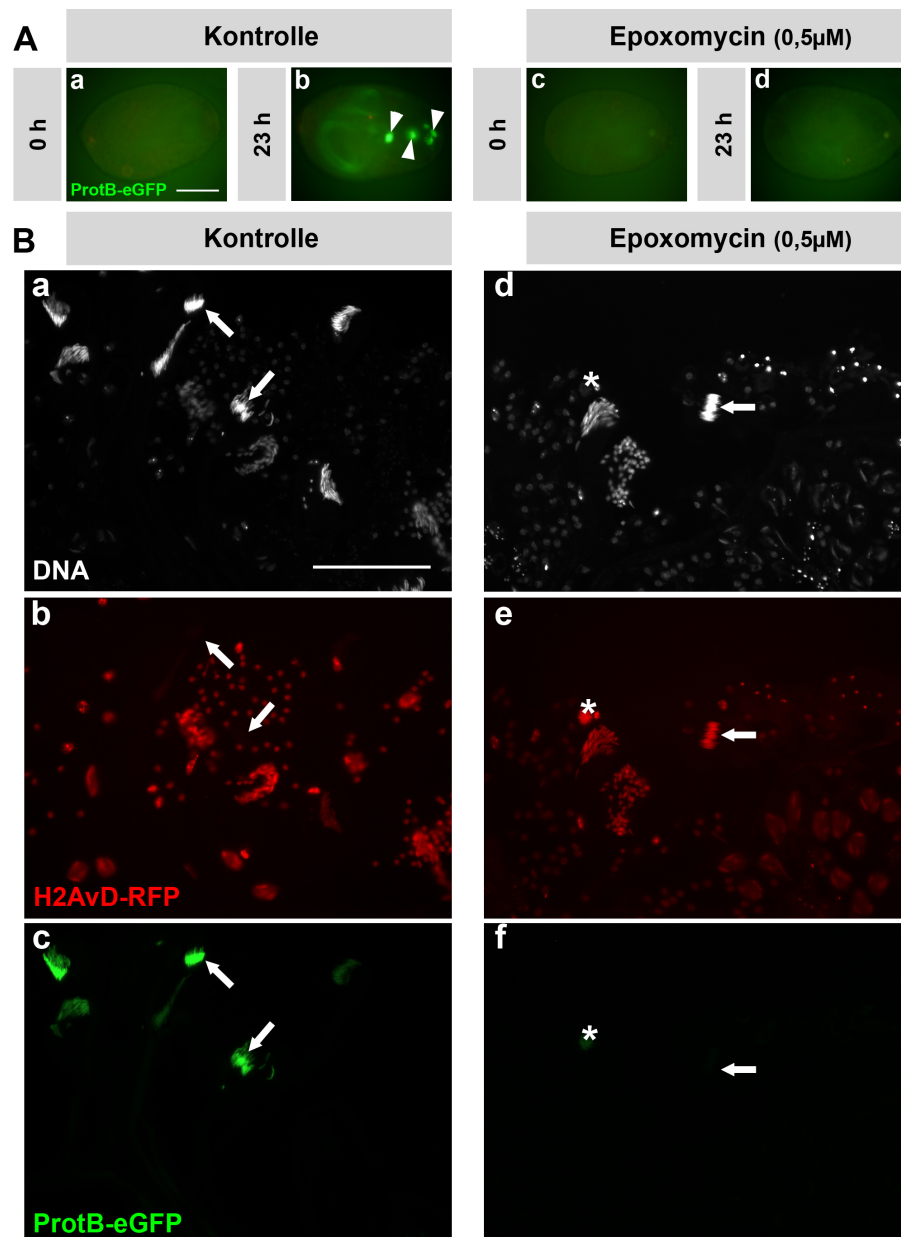


Abbildung 4.11: Epoxomycin blockiert den Histon-Protamin Wechsel in intakten, pupalen Testes. (A) Aus H2AvD-RFP- und ProtaminB-eGFP-exprimierenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) wurden Testes isoliert und in Kultur für 23 h entweder ohne Inhibitor (A, a und b) oder mit 0,5 µM Epoxomycin (A, c und d) inkubiert. Während sich in den Kontrolltestes ProtB-eGFP-positive Zysten (Pfeilköpfe in A, b) entwickeln, ist dies nicht der Fall in den mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomycin behandelten Testes (A, d). (B) Übersichtsaufnahmen von Quetschpräparaten aus unbehandelten (B, a-c) und Epoxomycin-behandelten (B, d-f) pupalen Testes. DNA wurde mit Hoechst angefärbt (B, a und d). In den Kontrolltestes entwickeln sich die Zysten durch den Histon-Protamin Wechsel. Es sind Spermatiden zu beobachten, die ProtaminB-eGFP aber kein H2AvD-RFP mehr exprimieren (Pfeile in B, c bzw. b). Nach Epoxomycin-Behandlung sind keine ProtB-eGFP-positiven Spermatiden zu finden (B, f). Die ältesten Stadien zeigen noch H2AvD-RFP Signal (Pfeil in B, e). Die Chromatinverteilung und Kernform der behandelten Nuklei weicht nicht wesentlich von den Kontrollnuklei ab. (in B, d-f *= autofluoreszente Fettkörperzelle) Maßstab in A und B = 100 µm

Epoxomycin ($0,5 \mu\text{M}$) behandelten Testes solche Zysten aufwies (0 von 14 Testes) (Abb. 4.11 A, d). Auch in Quetschpräparaten der behandelten Testes waren keine Protamin-exprimierenden Nuklei zu beobachten (Abb. 4.11 B, f). In den Quetschpräparaten zeigte sich jedoch deutlich, dass nach Epoxomycin-Behandlung die ältesten vorzufindenden Spermatiden dem Kanu-Stadium entsprechen und ein klares H2AvD-RFP Signal zeigen (Abb. 4.11 B, e). Die Chromatinverteilung der behandelten Nuklei unterscheidet sich nicht von den Kontrollnuklei (Abb. 4.11 B, d).

Die Inhibition des Proteasoms in Spermatiden von *Drosophila* scheint somit das Auftreten von Protamin-exprimierenden Spermatiden zu verhindern, indem es zu einer Blockade der weiteren Entwicklung in allen Stadien führt. Die Chromatinverteilung in den Nuklei erscheint unbeeinflusst und intakt.

4.4 Inhibition der Topoisomerase I- und II-Aktivität hat keinen Einfluss auf die postmeiotische Entwicklung von *Drosophila*-Spermatiden

Im Vergleich zum Chromatin somatischer Zellen weist das Chromatin reifer Säugerspermien weniger negative Supercoils auf, welches im Doughnut-Modell der protamin-basierten Chromatinstruktur berücksichtigt wurde (Ward, 1993). Die Auflösung der nukleosomalen Chromatinstruktur im Histon-Protamin Wechsel hat zur Folge, dass überschüssige Supercoils in der DNA zurückbleiben und vor der weiteren Kondensation abgebaut werden müssen. Durch Inhibitorstudien an Spermatiden der Maus zeigten Laberge und Boissonneault (2005) eine Verbindung zwischen den im H-P Wechsel beobachteten DNA-Doppelstrangbrüchen und der Aktivität von Topoisomerase II. Mithin gehen die derzeitigen Modelle zum Mechanismus des H-P Wechsels in Säugerspermien davon aus, dass Topoisomerase II verantwortlich für die Relaxation der Supercoils und Ursprung der Strangbrüche ist (Leduc et al., 2008). In Spermatiden von *Drosophila* zeigt sich ebenfalls ein starker Anstieg von DNA-Brüchen mit einem Maximum während des Histon-Protamin Wechsels im Kanu-Stadium (Rathke et al., 2007). Ob auch hier Topoisomerasen am Prozess der Histonablösung und des Protamineinbaus beteiligt sind, ist jedoch noch ungeklärt. Die Inhibition der Topoisomerase-Aktivität in pupalen Testes in Kultur sollte hierzu Aufschluss geben.

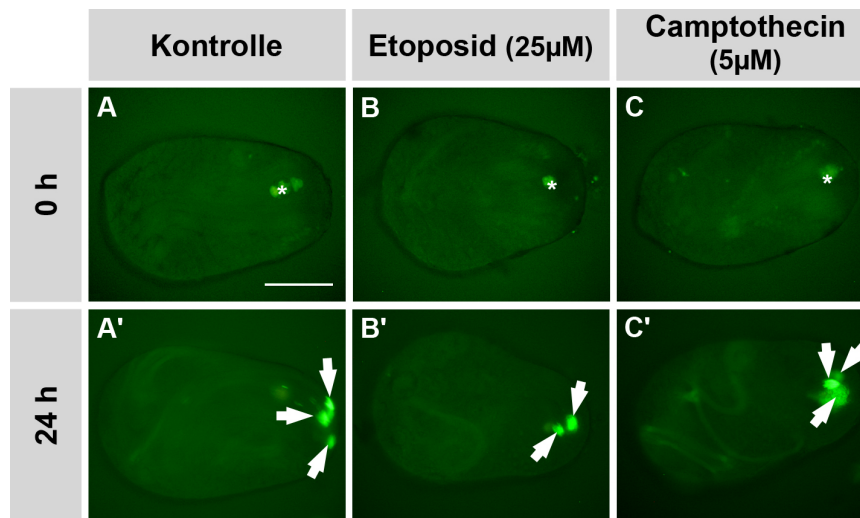


Abbildung 4.12: Etoposid und Camptothecin blockieren den Histon-Protamin Wechsel in kultivierten, intakten, pupalen Testes nicht. Aus ProtaminB-eGFP-exprimierenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) wurden Testes isoliert und in Kultur für ca. 24 h entweder ohne Inhibitor (A, A') oder mit 25 µM Etoposid (B, B') bzw. mit 5 µM Camptothecin (C, C') inkubiert. Sowohl mit dem Topoisomerase II-Hemmer Etoposid (B') als auch mit dem Topoisomerase I-Hemmer Camptothecin (C') entwickeln sich ProtB-eGFP-positive Zysten (Pfeile) genauso wie in der Kontrolle (A'). * = Eigenfluoreszenz putativer Fettkörperzellen; Maßstab 100 µm

Zunächst wurden Testes aus *protaminB-eGFP* tragenden Puppen (24 h nach Puppenbildung) isoliert und in Kultur genommen. Zur Inhibition von Typ II Topoisomerasen wurde der Inhibitor Etoposid verwendet, während Topoisomerasen des Typs I durch Camptothecin inhibiert werden sollten. Diese Verbindungen zählen zu den sogenannten „Cleavable Complex“-Inhibitoren, die Topoisomerasen nach Einführung des Strangbruchs an der DNA festsetzen (Übersichtsartikel: Bassi und Palitti, 2000). Weder Etoposid (25 µM) noch Camptothecin (5 µM) haben jedoch einen Einfluss auf das Auftreten von ProtaminB-eGFP-positiven Zysten in behandelten Testes nach ca. 24 h Inkubation (jeweils 39 getestete Testes für Etoposid und Kontrolle sowie 15 Testes für Camptothecin) (Abb. 4.12 B' und C'). Um zu prüfen, ob tatsächlich eine Inhibition stattfindet, wurden Quetschpräparate der kultivierten Testes angelegt. Mit Hilfe der TUNEL-Reaktion wurden Strangbrüche in den Spermatiden sichtbar gemacht. Beide Inhibitoren zeigen keinen Einfluss auf die Einführung von DNA-Strangbrüchen in den postmeiotischen Stadien (Abb. 4.13 vgl. Reihen B, D und F). Überraschenderweise zeigt jedoch auch das Chromatin der postmeiotischen Spermatiden keine Veränderung zu Kontrollnuklei, soweit dies in der lichtmikroskopischen Analyse sichtbar ist (Abb. 4.13 Reihen A, C und E). Prämeiotische Nuklei, z.B. des primären Spermatozyten Stadiums, weisen allerdings besonders stark deformiertes Chromatin auf, das an DNA-Degradation und -Kondensation erinnert (Abb. 4.13 Reihen C und E, Spalte 1).

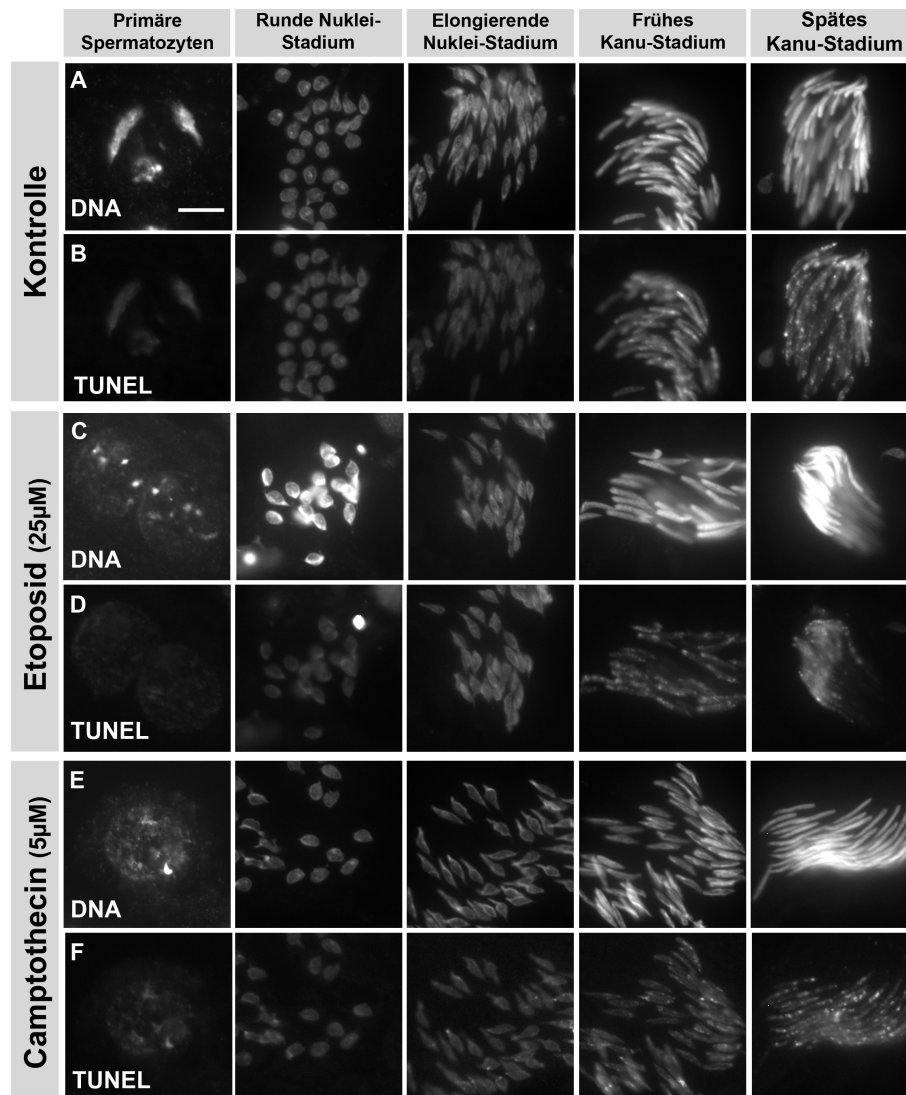


Abbildung 4.13: Etoposid und Camptothecin führen nur in prämeiotischen Stadien zu einer Veränderung der Chromatinverteilung. Quetschpräparate von Spermatidennuklei aus pupalen Testes nach ca. 24 h Inkubation ohne Inhibitor (Reihe A und B) oder mit 25 µM Etoposid (Reihe C und D) bzw. 5 µM Camptothecin (Reihe E und F). Die DNA der Nuklei wurde mit Hoechst angefärbt (Reihen A, C, E). DNA-Strangbrüche wurden mittels TUNEL-Reaktion markiert (Reihen B, D, F). Die Chromatinverteilung der postmeiotischen Nuklei bleibt trotz Inhibitor-Behandlung unverändert gegenüber der Kontrolle (Spalten 2-5 in Reihen A, C, E). Lediglich das Chromatin der prämeiotischen, primären Spermatozyten erscheint sowohl nach Etoposid- als auch nach Camptothecin-Behandlung deformiert und kondensiert (Spalte 1 in Reihen C und E). Allerdings zeigen diese Nuklei kein verstärktes TUNEL-Signal (Spalte 1 in Reihen D und F). Die postmeiotischen Stadien der behandelten Nuklei weisen auch im TUNEL-Signal keinen Unterschied zur Kontrolle auf (Spalten 2-5 in B, D, F). Maßstab 10 µm

Beide Inhibitoren, Etoposid und Camptothecin, setzen Topoisomerasen nach Einführung der Strangbrüche, kovalent an die DNA gebunden, fest. In replikativ und transkriptionell aktiven Zellen, wie den prämeiotischen Keimzellen im *Drosophila*-Testis, führt

dies oftmals zu permanenten, ungeschützten DNA-Strangbrüchen und zu einer Degradation und Deformation der DNA (Bassi und Palitti, 2000), bzw. zur Auslösung der Apoptose mit einem ähnlichen Effekt auf das Chromatin (Samejima und Earnshaw, 2005). Folglich scheinen beide Inhibitoren in prämeiotischen Keimzellen erfolgreich Topoisomerasen zu inhibieren, während in postmeiotischen Stadien das Chromatin unbeeinflusst bleibt, weiterhin DNA-Strangbrüche auftreten und Histone durch Protamine ersetzt werden. Dies deutet darauf hin, dass Topoisomerase-Aktivität keine essentielle Bedeutung für die Kernmorphogenese in der Spermatidenentwicklung von *Drosophila* hat.

5 Diskussion

5.1 Spermatiden in isolierten Zysten in Kultur durchlaufen die Meiose und innerhalb von 5 Stunden den vollständigen Histon-Protamin Wechsel

Die ersten Versuche mit kultivierten Zysten aus *Drosophila*-Testes fanden bereits in den 70er Jahren statt (siehe u.a. Kuroda, 1974). Schon hier zeigte sich, dass Zysten in Abhängigkeit vom Kulturmedium zu weiterer Entwicklung außerhalb des Testis fähig sind. Diese Methode wurde später verwendet, um die zeitliche Abfolge der *Drosophila*-Spermatidenstadien unter verschiedenen Kulturbedingungen zu untersuchen und einzelne Mechanismen dieses Prozesses näher zu beleuchten (Cross und Shellenbarger, 1979; Noguchi und Miller, 2003; Kawamoto et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Zysten kultiviert, die aus transgenen Fliegen mit H2AvD-RFP- und ProtaminB-eGFP-Expression stammten. Die angefertigten Zeitrafferaufnahmen zeigen, dass Spermatiden in isolierten Zysten in Kultur sowohl die Meiose als auch den Histon-Protamin Wechsel durchlaufen. Dabei verweilen die Nuklei auffällig länger im frühen Kanu-Stadium (ca. 20 h) als in anderen postmeiotischen Stadien (ca. 10 h; Abb. 4.1, S. 39). Möglicherweise finden im frühen Kanu-Stadium die Vorbereitungen für die Ablösung der Histone und die Chromatinreorganisation statt. Im späten Kanu-Stadium, ca. 60 h nach den meiotischen Teilungen, scheint der H-P Wechsel abgeschlossen zu sein. Die anschließende Entwicklung durch die Individualisierung bis hin zu reifen Spermien wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. In Zeitraffer-Studien von Noguchi und Miller (2003) ergab sich jedoch für die Individualisierung von Spermatiden in Kultur eine Dauer von ca. 10 h. Somit könnte man für die gesamte Spermiogenese in Kultur einen Zeitrahmen von ca. 70-80 h annehmen.

Kürzlich wurde in Kulturen, die mit Fliegenextrakt angereichert wurden, eine Dauer von lediglich 48 h für die postmeiotische Entwicklung gemessen (Kawamoto et al.,

2008). Eine ähnlich kurze Zeitspanne für die Spermiogenese in Kultur (45 h) gaben schon Cross und Shellenbarger (1979) an, schätzten diese Zeit aber selbst schon als zu kurz ein. Hier erweisen sich die Histon H2AvD-RFP und ProtaminB-eGFP Fusionsproteine der vorliegenden Arbeit als nützliche Marker für die späten postmeiotischen Stadien. Die bisher verwendeten Marker, Auftreten von Zeichen der Individualisierung und „coiling“, treten in Kultur häufig stark verfrüht auf, bevor der H-P Wechsel stattgefunden hat (ohne Abbildung). Die hier als Zeitrahmen für die Spermiogenese angenommenen 70-80 h liegen vergleichsweise nahe an einer mittels fixierten Präparaten geschätzten „*in vivo*“-Dauer von 96 h (Lindsley und Lifschytz, 1972).

Ebenfalls mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen und den Markern H2AvD-RFP und ProtaminB-eGFP konnte hier der gesamte Histon-Protamin Wechsel in isolierten, kultivierten Zysten verfolgt werden. Der Histon-Protamin Wechsel nimmt mit lediglich 5 h nur einen kurzen Zeitraum innerhalb der postmeiotischen Entwicklung ein (Abb. 4.2, S. 41). Während dieser Zeit werden die Histone wahrscheinlich nahezu vollständig von der DNA abgelöst und abgebaut (vgl. auch Abschnitt 5.3, S. 71). Der entgegengesetzte Prozess der Ablösung der Protamine und anschließenden Einbaus von Histonen findet bei der Bildung des männlichen Pronukleus in der Zygote statt. Dieser benötigt jedoch nur wenige Minuten, da schon die Zeit vom Eintritt des Spermiums bis zur ersten Mitose auf nur 17 min geschätzt wird (Rabinowitz, 1941). Dieses Ungleichgewicht zwischen Histon-Protamin und Protamin-Histon Wechsel könnte sich aus einem einfacheren Mechanismus erklären. So würden möglicherweise für die Ablösung der Protamine und den anschließenden Aufbau von Nukleosomen keine erneute Einführung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen benötigt. Während dies in *Drosophila* noch nicht geprüft wurde, konnten Bizzaro et al. (2000) mit Hilfe der *in situ*-nick translation-Methode keine Strangbrüche während der Bildung des männlichen Pronukleus in der Maus nachweisen. Acetyliertes Histon H4 spielt in diesem Prozess jedoch sowohl in *Drosophila* als auch in der Maus eine Rolle (Loppin et al., 2005; van der Heijden et al., 2006).

Während des Histon-Protamin Wechsels konnte in den in dieser Arbeit angefertigten Zeitrafferaufnahmen eine Überlappung der Expression von Histonen und Protaminen mit schwacher Intensität beobachtet werden. Diese Überlappung wurde zuvor in fixierten Präparaten so nicht beobachtet (Rathke et al., 2007). Aufgrund des schnellen Ablaufs des H-P Wechsels befinden sich zu einem gegebenen Zeitpunkt vermutlich nur

wenige Zysten in diesem Übergangsstadium und sind folglich in fixierten Präparaten ebenfalls nur sehr selten vertreten.

Die kurze Phase, in der die DNA mit nur wenigen Histonen und auch nur wenigen Protaminen assoziiert ist, wird durch die Expression von u.a. Tpl^{94D} überbrückt (Rathke et al., 2007). Es verdichten sich somit die Hinweise, dass in *Drosophila* ein dreistufiger Histon-Protamin Wechsel stattfindet, in dem transient exprimierte Proteine eine Funktion vergleichbar mit Transitionsproteinen der Säuger (TNP 1 und 2) ausüben könnten.

5.2 Bedeutung der Histon-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel

Untersuchungen der Spermatogenese von Karpfen und Winter-Flunder stützen die Annahme, dass der Acetylierung von Histon H4 im Histon-Protamin Wechsel eine besondere Bedeutung zukommt (Kennedy und Davies, 1980, 1981). In den Spermatiden dieser Tiere werden die somatischen Histone nicht durch andere Proteine ersetzt. In diesem Fall zeigt sich auch kein Anstieg der Histon H4-Acetylierung im Chromatin der Nuklei. In den Spermatiden der Maus findet bekanntlich ein Histon-Protamin Wechsel statt. Der Mechanismus dieses Wechsels weist dabei allerdings nicht nur eine gesteigerte Histon H4-Acetylierung auf, sondern auch einen Anstieg der Histon H3-Acetylierung an Lysin 9 (Hazzouri et al., 2000; Nair et al., 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an H3K9-Acetylierung mit einer längeren Verweildauer von Histon H3 am Chromatin während des H-P Wechsels einhergeht (Nair et al., 2008). Dies erlaubt die Hypothese, dass die Histone für ihre Ablösung von der Spermatiden-DNA acetyliert werden müssen.

Für den Histon-Protamin Wechsel von *Drosophila* konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Anstieg der H3K9-Acetylierung detektiert werden (siehe Abschnitt 4.2, S. 42). Nichtsdestotrotz wird in *Drosophila*-Spermatiden auch Histon H3 mit den anderen Histonen bis unter die (immunhistologische) Nachweisgrenze abgebaut (Rathke et al., 2007, und siehe auch Abb. 1.2 auf S. 12). Obwohl die Möglichkeit besteht, dass Histon H3 zusammen mit acetyliertem Histon H4 im Tetramer abgelöst und abgebaut wird, erscheint eine Rolle der Histon-Acetylierung ausschließlich für die Ablösung der Histone eher unwahrscheinlich.

5.2.1 Histon-Acetylierung ist nicht hinreichend, um den Histon-Protamin Wechsel zu induzieren

Die hier durchgeführten Inhibitorstudien an isolierten Zysten und intakten Testes zeigen, dass die Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDACs) das Auftreten von ProtaminB-eGFP-exprimierenden Spermatiden nicht verhindern kann. In späteren, postmeiotischen Stadien hatte der Inhibitor TSA keinen Einfluss auf die Acetylierung von Histon H4. Möglicherweise sinkt die Konzentration der HDACs postmeiotisch ab, so dass mit einsetzendem Abbau der HDACs die Acetylierung von Histon H4 zunimmt und sich so eine Art „Zeitzünder“-Mechanismus für den Beginn der Histon H4-Acetylierung ergibt. Ein vergleichbarer, postmeiotischer Abbau von HDACs konnte in Maus-Spermatiden schon gezeigt werden (Hazzouri et al., 2000). Zusätzlich könnte die Abwesenheit von HDACs in späten Stadien die Beobachtung erklären, dass die Histone sowohl in Maus- als auch in *Drosophila*-Spermatiden vor dem Abbau nicht deacetyliert und mitsamt ihren Modifikationen abgebaut werden (Hazzouri et al., 2000; Rathke et al., 2007). In frühen, postmeiotischen Spermatiden von *Drosophila* (runde Nuklei-Stadium) führt die HDAC-Inhibition dagegen zu einem Anstieg der Histon H4-Acetylierung, die im unbehandelten Zustand so nicht nachweisbar ist.

Mit Hilfe TSA-vermittelter HDAC-Inhibition zeigt sich also einerseits, dass die Aktivität von HDACs nicht essentiell für den Histon-Protamin Wechsel ist und andererseits, dass es auf diesem Weg möglich ist verfrühte Histon-Acetylierung auszulösen. Wider Erwarten führt die TSA-vermittelte, verfrühte Histon H4-Acetylierung allerdings nicht zu einem verfrühten Einsetzen des Histon-Protamin Wechsels. TSA-behandelte, isolierte Zysten des runde Nuklei-Stadiums entwickeln sich weiter zu einer elongierten Kernform, ohne dass ein verfrühter Histonabbau zu beobachten ist. Ebenso zeigen sich keine verfrühten DNA-Strangbrüche in Spermatiden aus TSA-behandelten Testes (vgl. dazu Abschnitt 4.2.3, S. 49, sowie 4.2.4, S. 50). Dies steht im Kontrast zu Arbeiten mit Spermatiden der Maus, in denen verfrühte Histon H4-Acetylierung mit dem verfrühten Auftreten von Strangbrüchen einherging (Laberge und Boissonneault, 2005). Es ist durchaus möglich, dass eine solche Verbindung zwischen Histon H4-Acetylierung und DNA-Brüchen in *Drosophila* nicht existiert und beide Prozesse von unterschiedlichen Auslösern abhängen.

Histon H4-Acetylierung ist also weder ausschließlich für die Induktion des Histon-Abbaus verantwortlich, noch ist es hinreichend als alleiniges Startsignal für den Histon-Protamin Wechsel.

5.2.2 Histon-Acetylierung ist essentiell für die Entwicklung von Spermatiden mit protaminbasiertem Chromatin

Nachdem der Abbau von Histonen nicht in allen Fällen mit einer Acetylierung verbunden ist (vgl. H3K9) und ferner diese nicht hinreichend für den Beginn des Histon-Protamin Wechsels ist, stellt sich die Frage, ob Histon-Acetylierung überhaupt von essentieller Bedeutung für diesen Reorganisationsprozess ist.

In dieser Arbeit wurden dazu ebenfalls Inhibitorstudien durchgeführt (siehe Abb. 4.6, S. 48). Nach Inkubation von pupalen Testes in Kultur mit dem HAT-Inhibitor Anacardsäure konnte keine Histon H4-Acetylierung in den Nuklei der Keimzellen mehr nachgewiesen werden. Die Histon-Acetylierung in sich entwickelnden Spermatiden wurde also erfolgreich unterdrückt und dies führte zu einer augenscheinlichen Kondensation des Chromatins. Vermutlich in Folge dieser Kondensation kommt es zu einem Entwicklungsstopp der Keimzellen und es treten keine ProtaminB-eGFP-positiven Zysten mehr auf (vgl. Abschnitt 4.2.1, S. 45). Im Gegensatz dazu induziert TSA-vermittelte Inhibition von HDACs eine offenere Chromatinstruktur und erlaubt auch weiterhin die Entwicklung der Zysten (siehe Abb. 4.6, S. 48 und Abschnitt 4.2.3, S. 49).

Offensichtlich ist die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen von essentieller Bedeutung für die Chromatinstruktur und damit der Entwicklung reifer Keimzellen in *Drosophila*.

5.2.3 Die Rolle der Histon H4-Acetylierung im Histon-Protamin Wechsel von *Drosophila*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die verstärkte Acetylierung von Histonen (besonders von H4) nicht als alleiniges Startsignal für den Histon-Protamin Wechsel dienen kann. Wie Eingangs schon diskutiert, ist die Acetylierung vermutlich auch nicht ausschließlich für die Ablösung der Histone von der DNA verantwortlich. Die Histon-Acetylierung muss also weitere Funktionen erfüllen, um essentiell an der Entwicklung der Spermatiden und am H-P Wechsel beteiligt zu sein.

Eine Beteiligung von H4-Acetylierung an der Einleitung von DNA-Reparaturmaßnahmen ist seit einiger Zeit bekannt. Dabei markiert acetyliertes Histon H4 Stellen mit Doppelstrangbrüchen an der DNA, öffnet das umliegende Chromatin und rekrutiert Reparatur-Proteine (Übersichtsartikel: Costelloe et al., 2006). Man könnte also ver-

muten, dass die H4-Acetylierung in Spermatiden als ein Merkmal der einsetzenden Reparatur von DNA-Strangbrüchen anzusehen ist. Dies kann allerdings nicht ohne weiteres gültig sein, da TSA-induzierte, verfrühte H4-Acetylierung in kultivierten Maus-Spermatiden ein ebenfalls verfrühtes Auftreten von Strangbrüchen zur Folge hatte (Laberge und Boissonneault, 2005). DNA-Strangbrüche wären somit abhängig vom Auftreten der Histon-Modifikation und nicht umgekehrt. In *Drosophila* besteht keine solche Abhängigkeit zwischen H4-Acetylierung und DNA-Strangbrüchen, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (siehe Abschnitt 4.2.4, S. 50). Allerdings zeigt eine TUNEL-Reaktion an Quetschpräparaten von unbehandelten *Drosophila*-Spermatiden, dass der größte Teil der DNA-Brüche erst nach dem Ersetzen der Histone durch die Protamine im späten Kanu-Stadium und darüber hinaus repariert wird (Rathke et al., 2007). Histon-Modifikationen können hier natürlich keine bedeutende Rolle mehr spielen. Weitere Untersuchungen werden hier Klarheit schaffen müssen.

Die Inhibitorstudien der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Histon-Acetylierung in Spermatiden essentiell für eine offene Chromatinstruktur ist und somit Einfluss auf die Entwicklung der Zellen hat. Dieser Einfluss könnte auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zunächst wäre eine Verknüpfung mit postmeiotischer Transkription denkbar. Nach der Meiose findet in *Drosophila*-Spermatiden keine generelle, umfangreiche Transkription von Genen mehr statt (Olivieri und Olivieri, 1965). Kürzlich wurde jedoch eine kleine Gruppe von Genen („cups and comets“ genannt) entdeckt, die nach dem runde Nuklei-Stadium transkribiert werden (Barreau et al., 2008). Bei Inhibition der Transkription in kultivierten *Drosophila*-Testes zeigte sich zwar kein Einfluss auf die Spermatidenentwicklung, aber in dieser Studie wurden nur Zysten bis zum runde Nuklei-Stadium beschrieben (Gould-Somero und Holland, 1974). Es besteht also die Möglichkeit, dass der Anacardsäure-induzierte Mangel an Histon H4-Acetylierung und die resultierende Chromatinkondensation die Transkription der „cups and comets“ und damit auch die Entwicklung der Zellen verhindert. Aufgrund der starken Zunahme der H4-Acetylierung erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass dies die einzige Funktion der Histon-Modifikation ist.

Neben einer Rolle in der Regulation der Transkription wurde nach Studien an Spermatiden des Hahns vorgeschlagen, dass die Histon H4-Acetylierung die Chromatinstruktur öffnet und so Bindestellen an der DNA freilegt (Oliva und Mezquita, 1982). Diese Bindestellen könnten dann von Proteinen mit Chromatinremodelling- oder Histon-Chaperonfunktion besetzt werden und damit weitere Schritte in der Spermatidenrei-

fung eingeleitet werden.

Zusätzlich zu diesen Mechanismen könnte ein übergeordnetes „Check-Point“-System durch die induzierten Störungen aktiviert werden und sicherstellen, dass fehlerhafte Spermatiden in ihrer Entwicklung arretiert werden.

5.2.4 CG2051 und PCAF sind Histon-Acetyltransferasen mit einer postmeiotischen Expression in *Drosophila*-Spermatiden

Die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit essentiell für die Entwicklung der Spermatiden im *Drosophila*-Testis zu sein. Der Frage nach möglichen HATs mit einer Rolle im Histon-Protamin Wechsel wurde hauptsächlich mit Hilfe einer stadienspezifischen RT-PCR-Methode nachgegangen. Dabei wurde in einem ersten Versuch die Anwesenheit der mRNA von vier HATs mit bekannter Hochregulation der Expression im Testis überprüft (vgl. Abschnitt 4.2.6, S. 55). Die Transkripte von nur zwei der getesteten HATs sind nach diesen Ergebnissen postmeiotisch vertreten, PCAF und CG2051.

PCAF-mRNA findet sich postmeiotisch im runde Nuklei-Stadium, ist in den Stadien mit starker Histon-Acetylierung allerdings nicht mehr detektierbar und tritt dann ab dem späten Kanu-Stadium wieder auf. Dieses Expressionsmuster ist überraschend, insofern es nur durch postmeiotische *de novo*-Transkription erklärbar ist. Ob jedoch PCAF tatsächlich eine weitere Ausnahme von der postmeiotischen Transkriptionsblockade ist, vergleichbar z.B. mit den „cups and comets“-Genen (Barreau et al., 2008), muss in weiteren Versuchen überprüft werden. Obwohl das bevorzugte Substrat von PCAF bekanntermaßen die Histone H3 und H4 sind, scheint eine Rolle in den Stadien der Histon-Acetylierung unwahrscheinlich, da hier die mRNA nicht mehr detektiert werden konnte. Interessanterweise sind jedoch HATs der GNAT-Superfamilie bekannt für ihre Beteiligung an der DNA-Reparatur (Übersichtsartikel: Lee und Workman, 2007). Zumindest das erneute, späte Auftreten der mRNA dieser HAT könnte somit der schnellen Bereitstellung von Komponenten der DNA-Reparatur in der Zygote nach dem Protamin-Histon Wechsel dienen. Eine direkte Rolle von PCAF in der DNA-Reparatur postmeiotischer Spermatiden scheint dagegen ausgeschlossen, da vermutlich der weitaus größte Teil der Histone zu diesem Zeitpunkt schon abgebaut wurde.

Die zweite, untersuchte HAT, CG2051, gehört keiner bekannten HAT-Familie an. Ihre mRNA ist bis zum frühen Kanu-Stadium exprimiert (siehe Abschnitt 4.2.6, S. 55) und das Protein könnte somit eine Rolle im Histon-Protamin Wechsel spielen. Interessant ist

hier eine annotierte Interaktion zwischen CG2051 und zwei HMG-Box Proteinen (Dro-ID Datenbank Yu et al., 2008). Diese Proteine sind nach ersten, vorläufigen Erkenntnissen postmeiotisch bis zum Kanu-Stadium in Spermatiden von *Drosophila* exprimiert (S. Gärtner, C. Rathke und R. Renkawitz-Pohl pers. Mitteilung). Eine mögliche Funktion der HMG-Box Proteine zur Rekrutierung der HAT CG2051 an die DNA liegt nahe. Weitere Untersuchungen dazu fehlen jedoch noch.

Mit Hilfe der stadienspezifischen RT-PCR-Methode konnte mit CG2051 ein aussichtsreicher Kandidat für eine HAT mit einer Rolle im Histon-Protamin Wechsel gefunden werden. Die bisher nur vorläufigen Ergebnisse sollten jedoch verifiziert werden.

5.3 Epoxomycin-vermittelte Inhibition des Proteasoms verhindert die Weiterentwicklung postmeiotischer Spermatiden von *Drosophila*

Der Abbau der Histone im H-P Wechsel ist bei Ratte, Maus und Mensch nicht vollständig (Miller et al., 2009). Sehr spezifische Bereiche des Genoms bleiben bis in die reifen Spermien hinein mit Nukleosomen assoziiert (Hammoud et al., 2009). Interessanterweise sind dies Bereiche, die vornehmlich für Gene der Embryogenese kodieren und der Schluss liegt nahe, dass diese Bereiche gezielt für die schnelle Transkription im Pronukleus „frei“-gehalten werden (Arpanahi et al., 2009). Allerdings wurde bisher keine vergleichbare Organisation in *Drosophila*-Spermien beobachtet. Immunhistochemisch lassen sich schon früh nach dem H-P Wechsel keine Histone mehr nachweisen (Rathke et al., 2007, siehe auch Abb. 1.2 auf S. 12). Dorus et al. (2006) konnten jedoch Histone in Proteomstudien an reifen Spermien detektieren. In *Drosophila* ist also noch nicht endgültig geklärt, ob Histone an der Spermien-DNA verbleiben. Sicherlich wird jedoch der größte Teil im Kanu-Stadium abgebaut. Für diesen umfangreichen Proteinabbau kommt vor allem das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) in Frage, dessen Bestandteile auch nukleär in Säuger- und *Drosophila*-Spermatiden nachgewiesen wurden (Haraguchi et al., 2007; Zhong und Belote, 2007). Dabei sind bei *Drosophila* sogar testisspezifische Untereinheiten des UPS bekannt, deren Funktion mit der Spermatidenentwicklung verknüpft sein könnte (Übersichtsartikel: Belote und Zhong, 2009).

In den hier durchgeführten Versuchen konnte die Rolle des UPS für den Histonab-

bau im Histon-Protamin Wechsel jedoch nicht überprüft werden. Das in den Inhibitorstudien an kultivierten, pupalen Testes eingesetzte Epoxomycin ist ein bekannter Proteasom-Inhibitor, der kovalent an mehrere der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms bindet (Meng et al., 1999). Ohne die Chromatinverteilung der Spermatidenkerne sichtbar zu verändern, verhindert Epoxomycin die Entwicklung von ProtaminB-eGFP-positiven Zysten in pupalen *Drosophila*-Testes in Kultur (siehe Abschnitt 4.3, S. 58). Dieses Ergebnis kann jedoch vermutlich auf eine Entwicklungsblockade der Spermatiden zurückgeführt werden, da sich die ältesten nachweisbaren Zysten im Histon-gebundenen, frühen Kanu-Stadium befanden. Dabei wird die proteasomale Aktivität möglicherweise für die Regulation der translationalen Repression benötigt. Ein Modell zur translationalen Repression während der Spermatogenese geht davon aus, dass RNA-bindende Proteine an die zu reprimierenden Transkripte binden und die Translation verhindern (Übersichtsartikel: Venables und Eperon, 1999). Diese Proteine könnten bei inhibiertem Proteasom nicht abgebaut werden und würden die Repression aufrechterhalten. Essentielle Transkripte, deren translationale Repression auf diesem Weg vermittelt wird, könnten somit nicht korrekt oder gar nicht translatiert werden und die weitere Entwicklung der Spermatiden wäre blockiert. Folglich ist in einem solchen Experiment auch kein Histonabbau zu beobachten.

5.4 Die DNA-Brüche des Histon-Protamin Wechsels stehen möglicherweise nicht in Verbindung mit Topoisomerase-Aktivität

Die Ablösung der Histone von der DNA in Spermatiden des Histon-Protamin Wechsels hinterlässt negative Supercoils, die zunächst abgebaut werden müssen, bevor die protaminbasierte Chromatinstruktur ausgebildet werden kann (Ward, 1993). Ein Weg dies zu erreichen ist die Einführung von DNA-Strangbrüchen und deren anschließende Religation. DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, die eben diese Art von Reaktion durchführen (Übersichtsartikel: Champoux, 2001; Wang, 2002). Derzeit sind zwei Typen von Topoisomerasen bekannt, die jeweils in weitere zwei Subtypen unterschieden werden: Typ I mit Subtyp IA und IB sowie Typ II mit Subtyp IIA und IIB. Typ IA Topoisomerasen binden vornehmlich an transient einzelsträngige, also aufgeschmolzene, DNA-Bereiche und führen einen Einzelstrangbruch ein. Dabei bleibt das 5'-Ende

des geschnittenen Strangs durch kovalente Bindung am Enzym fixiert. Der Subtyp IB verfährt ähnlich, präferiert jedoch doppelsträngige Bereiche als Substrat und fixiert das geschnittene 3'-Ende. Typ II Topoisomerasen hingegen sind in der Lage Doppelstrangbrüche in eine DNA-Helix zu schneiden und eine zweite Helix durch diese Lücke zu führen. Sie binden dabei kovalent an die frei gewordenen 5'-Enden der DNA, während die 3'-Enden über eine schwächere Interaktion ebenfalls fixiert werden, um eine Rotation der DNA-Helix zu verhindern. In Inhibitorstudien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Topoisomerasen des Typs II und dem Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen in kultivierten, elongierenden Spermatiden der Maus (Laberge und Boissonneault, 2005). Zusätzlich konnte in den postmeiotischen Stadien Topoisomerase IIB (TopIIB gehört zum Subtyp IIA) immunhistochemisch nachgewiesen werden (Leduc et al., 2008). Derzeit wird daher davon ausgegangen, dass eine Topoisomerase des Typs II am Histon-Protamin Wechsel der Säuger beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob auch die in *Drosophila* im H-P Wechsel auftretenden DNA-Brüche mit einer Topoisomerase-Aktivität zusammenhängen. Dazu wurden pupale Testes in Kultur mit Topoisomerase-Inhibitoren inkubiert und der Einfluss auf die Spermatidenentwicklung beobachtet (siehe Abschnitt 4.4, S. 60). Etoposid diene als Inhibitor für Topoisomerasen des Typs II und Camptothecin als Inhibitor für Topoisomerasen des Typs I. Beide Verbindungen gehören zu den „Cleavable Complex“-Inhibitoren (Übersichtsartikel: Bassi und Palitti, 2000). Sie verhindern die Religation der gesetzten Strangbrüche durch die Topoisomerase und fixieren auf diese Weise das Enzym im kovalent an die DNA gebundenen Zustand. Dieser DNA-Topoisomerase-Komplex kann z.B. durch SDS aufgelöst werden (daher der Name) und der DNA-Strangbruch wird freigesetzt.

Sowohl die Behandlung mit Etoposid als auch mit Camptothecin hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung postmeiotischer Spermatiden sowie die Chromatinverteilung und das Auftreten von DNA-Brüchen im H-P Wechsel. Lediglich in prämeiotischen Stadien zeigte sich eine Deformation und Kondensation des Chromatins. Dieser Effekt beruht vermutlich einerseits darauf, dass Topoisomerasen an der Trennung von replizierten Chromosomenpaaren in Mitose und Meiose beteiligt sind. Eine Inhibition der Topoisomerasen führt dabei häufig zu chromosomalen Aberrationen. Andererseits können in den replikativ oder transkriptionell sehr aktiven prämeiotischen Zellen Replikationsgabeln oder Polymerasen mit den festgesetzten Topoisomerasen kollidieren und freie DNA-Brüche entstehen (Übersichtsartikel: Degrossi et al., 2004). Dies führt

in den meisten Fällen auch zur Aktivierung des Apoptose-Mechanismus der Zellen. Die Apoptose geht mit einer anfänglichen Kondensation des Chromatins einher und könnte ebenfalls für die beobachtete Chromatindeformation der behandelten prämeiotischen Zellen verantwortlich sein (Samejima und Earnshaw, 2005). Somit scheinen Etoposid und Camptothecin erfolgreich Topoisomerasen in Keimzellen des *Drosophila*-Testes zu inhibieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass weder die Aktivität von Topoisomerasen des Typs I noch des Typs II in postmeiotischen Spermatiden benötigt wird. Der Mechanismus nach dem Etoposid und Camptothecin wirken bedingt jedoch eine Einschränkung dieser Interpretation. Die Topoisomerase ist in der Lage zunächst einen Strangbruch- und Relaxations-Zyklus zu durchlaufen, bevor sie durch die Inhibitoren blockiert wird. Sollte diese Entspannung der DNA ausreichen und die Anwesenheit der blockierten DNA-Topoisomerase-Komplexe keinen Einfluss auf die Ausbildung der neuen Chromatinstruktur haben, wäre auch mit inhibierten Topoisomerasen eine weitere Entwicklung der Spermatiden möglich. Endgültige Sicherheit könnten hier weitere Versuche mit katalytischen Topoisomerase-Inhibitoren bringen. Diese Inhibitoren verhindern mit verschiedenen Wirkmechanismen schon die Einführung von Strangbrüchen durch die Topoisomerasen (Bassi und Palitti, 2000). Gegen eine Beteiligung von Topoisomerasen am H-P Wechsel in *Drosophila*-Spermatiden sprechen jedoch auch vorläufige Ergebnisse aus *in situ*-Hybridisierungen und stadienspezifischen RT-PCR Analysen (C. Ripp, Master-Arbeit, 2009). Die Expression von Topoisomerase 2 (Subtyp IIA) konnte dabei lediglich in prämeiotischen Keimzellen des *Drosophila*-Testis nachgewiesen werden. Diese Topoisomerase steht im H-P Wechsel also vermutlich nicht zur Verfügung. Das Transkript der *Drosophila*-Topoisomerase I (Subtyp IB) scheint dagegen bis in frühe postmeiotische Stadien vorzuliegen. Wie Eingangs erwähnt, erzeugen Topoisomerasen des Typs IB jedoch keine freien 3'-OH-Enden und ihre Strangbrüche dürften somit nicht mit Hilfe der TUNEL-Reaktion sichtbar werden (Grosse und Manns, 1993). Sie können folglich nicht für die Brüche des Histon-Protamin Wechsels verantwortlich sein. Neben diesen beiden Topoisomerasen besitzt *Drosophila* noch zwei Topoisomerasen des Typs IA (TopIII α und TopIII β) (Wang, 2002). Aufgrund ihrer Substrat-Präferenz für einzelsträngige DNA scheint jedoch auch hier eine Beteiligung am Histon-Protamin Wechsel fraglich.

Interessanterweise zeigten Leduc et al. (2008) durch immunhistologische Analysen an Testes der Maus, dass nur die Topoisomerase-Isoform TopIIB in postmeiotischen Stadien vorzufinden ist, während die Isoform TopIIA nur bis zur Meiose exprimiert ist.

Die beiden Isoformen sind vermutlich aus einer Genduplikation entstanden (Sng et al., 1999) und eine der Kopien könnte eine spezifisch postmeiotische Funktion entwickelt haben. Im Gegensatz zu den Säugern weist *Drosophila* nur eine Topoisomerase II-Isoform auf (Top2 vom Subtyp IIA) (Wang, 2002). Möglicherweise ist dieses Protein nicht in der Lage sowohl prä- als auch postmeiotische Funktionen zu erfüllen und ein anderer Enzymtyp hat diese Lücke in *Drosophila*-Spermatiden gefüllt. Neben Topoisomerasen können auch Nukleasen DNA-Strangbrüche induzieren. Nukleasen hydrolysieren die Phosphodiester-Bindung des DNA-Rückgrats und produzieren Einzelstrangbrüche mit zumeist 3'-OH Enden (Galburt und Stoddard, 2002; Sasnauskas et al., 2010). Sie spielen unter anderem eine Rolle bei der Apoptose (Samejima und Earnshaw, 2005), verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen (Mimitou und Symington, 2009; Nagy und Soutoglou, 2009) und der RNA-Interferenz (Wu und Belasco, 2008). Im Gegensatz zu Topoisomerasen sind Nukleasen jedoch nicht in der Lage die geschnittenen DNA-Enden zu ligieren.

In den Spermatiden von *Drosophila* könnten Nukleasen zusammen mit weiteren Proteinen, wie z.B. Ligasen, die Funktion übernehmen, die Topoisomerase II in der Spermiogenese der Säuger erfüllt. In diesem Modell würde eine Endodeoxynuklease einen Einzelstrangsnitt setzen und eine Entspannung der DNA ermöglichen. Der Strangbruch könnte daraufhin von einer mit der Nuklease interagierenden Ligase direkt wieder verschlossen werden, wobei die transient exprimierten HMG-Box Proteine, wie Tpl^{94D}, diese Reaktion erleichtern. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass DNA-Einzelstrangbrüche im H-P Wechsel von *Drosophila* auftreten. Nukleasen wären jedoch als Dimer in einem Komplex auch in der Lage Doppelstrangbrüche zu induzieren. Der Reparatur der eingefügten Strangbrüche dürfte in diesem Fall eine besondere Bedeutung zukommen.

Welche Reparaturmechanismen in den Spermatiden von *Drosophila* möglicherweise aktiv sind ist bisher unklar. Durch den haploiden Zustand des postmeiotischen Genoms können jedoch keine der Mechanismen mit Abhängigkeit von Schwesterchromatiden, wie z.B. homologe Rekombination, beteiligt sein. Im Falle von DNA-Doppelstrangbrüchen wäre nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (*non-homologous end joining* - NHEJ) ein möglicher Reparaturweg. Interessanterweise wurden die beteiligten Proteine Ku70 und Ku80 im Testis von *Drosophila* und Ku70 in den Spermatiden des Grashüpfers *Eyprepocnemis plorans* schon nachgewiesen (Boutanaev et al., 2007; Cabrero et al., 2007). Die Reparatur von Strangbrüchen durch NHEJ ist jedoch stark

fehlerbehaftet und könnte selbst potentiell schädlich für die Integrität des männlichen Genoms sein (Lieber, 2008).

Alternativ besteht ebenso die Möglichkeit, dass die Strangbrüche in den reifen Spermien von *Drosophila* persistieren, aber aufgrund der starken Chromatinkondensation nicht mittels TUNEL-Reaktion detektiert werden. Erst während des Protamin-Histon Wechsels in der Zygote könnte es dann zur Reparatur kommen. HMG-Box tragende Proteine, wie z.B. die *Drosophila*-Protamine, könnten hier die Funktion eines molekularen Klebers für die Bruchenden ausüben. Das Auftreten von Strangbrüchen bzw. von Zeichen eines früh aktiven Reparaturmechanismus während der männlichen Pronukleusbildung in *Drosophila* wurde jedoch noch nicht untersucht. Bei Zygoten der Maus konnte allerdings nach vorangehender Bestrahlung der reifen Spermien die Aktivität des NHEJ-Mechanismus im Protamin-Histon Wechsel aufgezeigt werden (Derijck et al., 2008).

5.5 Neues Arbeitsmodell zum Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben eine neue Sicht auf das vorhergehende Arbeitsmodell zum molekularen Ablauf des Histon-Protamin Wechsels in Spermatiden von *Drosophila*. So erscheint nun z.B. die Hypothese der Histon H4-Acetylierung als alleiniges Startsignal nicht mehr haltbar. Ebenso ist eine Beteiligung von Topoisomerasen des Typs I und II an der Einführung der DNA-Brüche jetzt fraglich. Diese Beobachtungen wurden entsprechend in einem neuen, veränderten Arbeitsmodell zusammengefasst (Abb. 5.1, S. 78).

(A) Mit dem Ende des runden Nuklei-Stadiums sinkt möglicherweise aus noch ungeklärten Gründen die Konzentration der Histon-Deacetylasen in den Nuklei der Spermatiden ab. Histon-Acetyltransferasen bleiben jedoch weiter aktiv und die Acetylierung einiger Histone nimmt zu. Die verstärkte Acetylierung führt zu einer Öffnung des Chromatins. Diese aufgelockerte Struktur scheint essentiell für die weitere Entwicklung der Spermatiden zu sein, aber die genauen Gründe dafür sind noch unbekannt (vgl. Abschnitt 5.2.3 in der Diskussion, S. 68).

(B) Auf ein weiterhin unbekanntes Startsignal hin könnten Bromodomänen-Proteine an das Chromatin binden und Chromatinremodelling-Komplexe oder Histon-Chaperone

rekrutieren. Diese würden die Histone mitsamt ihrer Modifikationen von der DNA ablösen. Das Startsignal könnte, ähnlich wie die H4-Acetylierung und die resultierende Chromatinöffnung, aus einer Kaskade von Proteinabbau und Ansammlung einer post-translationalen Modifikation stammen. Auf diese Weise wäre der Ablauf des Histon-Protamin Wechsels weitgehend unabhängig von postmeiotischer Transkription. Mit der Öffnung des Chromatins und dem Beginn der Ablösung der Histone hätten Nukleasen Zugang zur DNA und könnten DNA-Strangbrüche einfügen. Diese Brüche erlauben einerseits eine Entspannung der DNA nach Auflösung der Nukleosomen und könnten andererseits den Zugang zur DNA weiter erleichtern.

(C) Weiterhin ist das Ubiquitin-Proteasom-System sehr wahrscheinlich am Abbau der Histone und anderer Proteine im Histon-Protamin Wechsel beteiligt.

(D) Sollten nicht Topoisomerasen sondern Nukleasen verantwortlich für das Auftreten der DNA-Strangbrüche in den Spermatiden sein, sind weitere Änderungen des Modells zu fordern. So gewinnt der Reparatur- und Religationsmechanismus eine sehr viel größere Bedeutung, wenn die Topoisomerase-eigene Fähigkeit zur Religation der Brüche nicht genutzt werden kann. Im Falle von DNA-Einzelstrangbrüchen könnte eine direkte Interaktion zwischen der Nuklease und Ligasen zu einer schnellen Religation der Brüche führen. Sollten DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden, wäre zu erwarten, dass der Reparatur-Mechanismus zunächst auch ein Abdiffundieren der Bruchenden verhindert und anschließend die Religation ermöglicht. Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung wäre ein Reparaturweg mit diesen Fähigkeiten (Übersichtsartikel: van Gent und van der Burg, 2007). Die Funktion der transient exprimierten HMG-Box Proteine, wie z.B. Tpl^{94D}, könnte ebenfalls mit der Reparatur der DNA-Brüche und dem Schutz der DNA vor weiteren Nuklease-Angriffen zusammenhängen.

(E) Die transient exprimierten HMG-Box Proteine (wie z.B. Tpl^{94D} und Priapos) binden möglicherweise an die DNA und könnten zunächst den weiteren Zugang der Nukleasen zur DNA abwehren. Zusätzlich könnte ihre Bindung auch die Ligation der DNA-Brüche erleichtern. Auf diese Weise können nach Abschluss des Histon-Protamin Wechsels nach und nach immer weniger DNA-Brüche mittels TUNEL-Reaktion detektiert werden. In der abschließenden Phase mit protaminbasiertem Chromatin bildet sich die neue, kompaktere Chromatinstruktur der reifen Spermien aus. Dabei bleibt weiter unklar, ob die *Drosophila*-Protamine eine mit den Säugern vergleichbare Doughnut-Struktur verursachen.

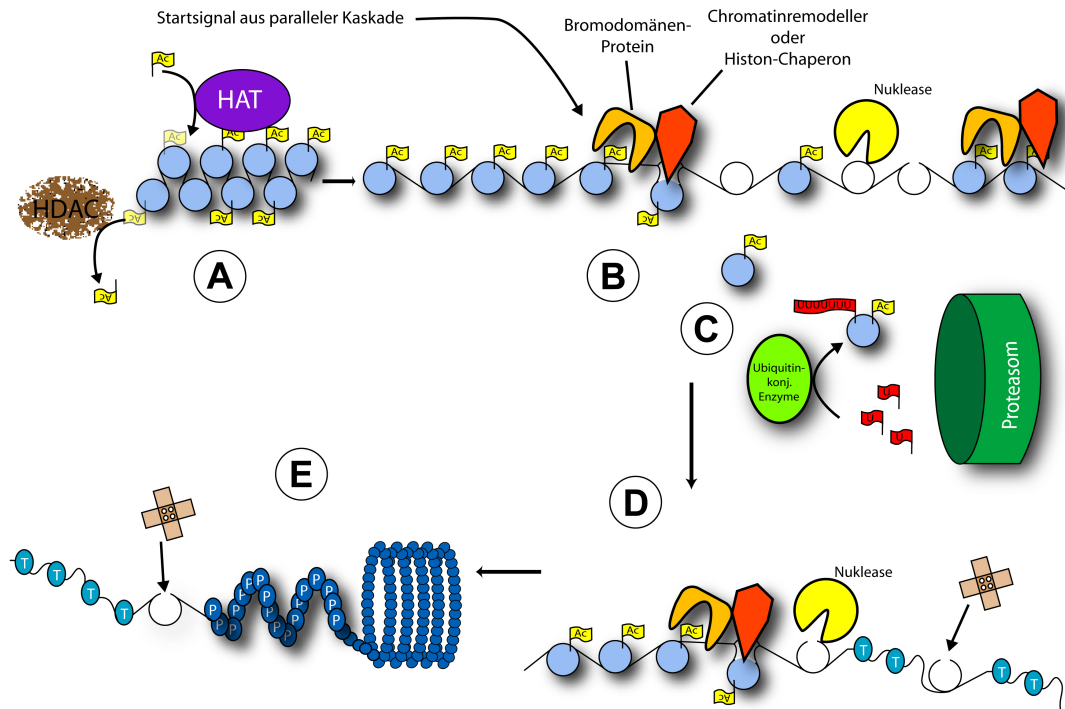


Abbildung 5.1: Verändertes Arbeitsmodell zum molekularen Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels in Spermatiden von *Drosophila melanogaster*. (A) Nach Rückgang der HDAC-Konzentration sammelt sich die HAT-vermittelte Histon-Acetylierung langsam an und das Chromatin geht in eine geöffnete Struktur über. (B) Das weiterhin noch unbekannte Startsignal aus einer anderen, möglicherweise ähnlichen Kaskade, führt dazu, dass Bromodomänen-Proteine an die acetylierten Histone binden. Diese rekrutieren Histon-Chaperone oder Chromatinremodeller, welche die Histone von der DNA ablösen. Für die Bindung an das Chromatin ist die offene Struktur eine Voraussetzung. Zugang zur DNA wird weiter erleichtert durch die Aktivität von Nukleasen, die Strangbrüche setzen und die DNA entspannen. (C) Die abgelösten Histone werden vom Ubiquitin-Proteasom-System noch im Kern abgebaut. (D) Noch während der Histon-Ablösung werden transient exprimierte Proteine, wie Tpl^{94D} (T), an die DNA angelagert, um weiteren Abbau der DNA durch Nukleasen zu verhindern und die Religation bzw. Reparatur der Strangbrüche zu erleichtern. (E) Die transient exprimierten Proteine werden durch den Einbau der Protamine verdrängt. Die Protamine schützen die DNA vor weiteren Angriffen der Nukleasen. Sie führen außerdem zu einer sehr kompakten, möglicherweise mit der Doughnut-Struktur der Säuger vergleichbaren, Chromatinstruktur in den reifen Spermien.

5.6 Ausblick

Das Arbeitsmodell zum molekularen Mechanismus des Histon-Protamin Wechsels in *Drosophila* bietet eine Reihe von Punkten, die überprüft und getestet werden sollten und können. Einige von diesen Punkten sind:

Zunächst wäre das postulierte Absinken der HDAC-Konzentration in postmeiotischen Stadien zu überprüfen. Neben einer *in situ*-Hybridisierung könnte hier auch die stadienspezifische Einzelzysten RT-PCR angewendet werden, denn bei Verwendung einer „real-time“-PCR wäre es dabei auch möglich Aussagen über die genaue Quantität der Transkripte zu treffen. Sollte die HDAC-Expression jedoch auf Ebene der Proteinstabilität reguliert sein, bietet sich eine immunhistochemische Analyse an. Stadienspezi-

fische Protein-Extraktion und anschließende Immundetektion in einem Western-Blot böte sich ebenfalls an, könnte jedoch an der wahrscheinlich sehr geringen Ausbeute des Proteinextrakts aus einzeln bzw. wenigen Zysten scheitern.

Ob die Acetylierung von Histon H4 über die Öffnung des Chromatins hinaus weitere Funktionen erfüllt, bleibt unklar. Die Rekrutierung von Chromatinremodelling-Komplexen könnte eine dieser Funktionen sein. Mittels Koimmunpräzipitationen mit acetyliertem Histon H4 könnten Proteine gefunden werden, die an diese posttranslationale Modifikation während des H-P Wechsels binden. Allerdings müssten diese Versuche mit stadienspezifischen Proteinextrakten durchgeführt werden und die vermutlich geringe Proteinausbeute aus wenigen isolierten Zysten könnte daher auch hier problematisch sein.

Die Hypothese, dass Nukleasen für die DNA-Brüche des H-P Wechsels in *Drosophila* verantwortlich sind, ist ebenfalls zu testen. Inhibitorstudien mit Nuklease-Inhibitoren (z.B. Aurintrikarboxylsäure) wären eine Möglichkeit in diesem Zusammenhang. In *Drosophila* sind nur wenige Proteine mit einer Endodeoxynukleasefunktion annotiert (Fly-Base Datenbank Tweedie et al., 2009). Ihre Expressionsmuster im Testis könnten ebenfalls überprüft werden, um mögliche Kandidaten zu identifizieren.

Die Art der Strangbrüche im H-P Wechsel von *Drosophila* ist noch unbekannt. Mit Hilfe von Einzelzelelektrophorese (*comet assay*) von Spermatiden des Kanu-Stadiums könnte zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen unterschieden werden. Dies könnte weitere Schlüsse auf das DNA-Bruch-verursachende Agens zulassen. Mit dieser Technik könnte auch geklärt werden, ob die DNA-Brüche noch in den reifen Spermien vorzufinden sind und sie erst in der Zygote repariert werden.

Bei allen oben genannten Punkten wäre die Kenntnis der in den einzelnen Stadien der Spermiogenese exprimierten Proteine von sehr großem Vorteil, um gezielter Kandidaten einzugrenzen bzw. mögliche Interaktionspartner vorherzusagen. Solche stadienspezifischen Transkriptom- oder Proteomanalysen könnten durch die Isolation einzelner Zysten aus verschiedenen Stadien der Spermiogenese möglich werden. Allerdings wäre vermutlich auch hier die erzielte Menge des Ausgangsmaterials (besonders im Falle einer Proteomanalyse) der limitierende Faktor.

Abschließend ergibt sich aus der Methode der Isolation einzelner Zysten und ihrer Entwicklung in Kultur eine interessante Möglichkeit zur Analyse der Funktion von Genen mit bekannter Bedeutung in anderen Geweben, bzw. früheren Stadien der Spermatogenese. Dabei könnten RNAi- oder Antisense-RNA-Konstrukte in die kultivierten Zysten transfiziert und somit Genfunktionsverluste stadienspezifisch analysiert werden.

Literaturverzeichnis

- Akhmanova, A., Miedema, K., Wang, Y., Van Bruggen, M., Berden, J.H.M., Moudrianakis, E.N. und Hennig, W. (1997). The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of *Drosophila* males as established with a histone H3.3-specific antiserum. *Chromosoma* 106, 335–347.
- Arama, E., Agapite, J. und Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* 4, 687–697.
- Arama, E., Bader, M., Srivastava, M., Bergmann, A. und Steller, H. (2006). The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *EMBO J.* 25, 232–243.
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P. und Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 19, 1338–1349.
- Ausió, J. (1999). Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 31115–31118.
- Awe, S. und Renkawitz-Pohl, R. (2010). Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56, *in Druck*.
- Baarends, W.M., van der Laan, R. und Grootegoed, J.A. (2001). DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 121, 31–39.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A. und Kundu, T.K. (2003). Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J. Biol. Chem.* 278, 19134–19140.

- Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R.A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P.P. und Kundu, T.P. (2004). Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J. Biol. Chem.* *279*, 33716–33726.
- Balhorn, R., Brewer, L. und Corzett, M. (2000). DNA condensation by Protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* *56*, 230–234.
- Balhorn, R., Gledhill, B.L. und Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: Quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* *16*, 4074–4080.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Gen. Biol.* *8*, 227–234.
- Barreau, C., Benson, E., Gudmannsdottir, E., Newton, F. und White-Cooper, H. (2008). Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Development* *135*, 1897–1902.
- Bassi, L. und Palitti, F. (2000). Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. *Gen. Mol. Biol.* *23*, 1065–1069.
- Belote, J.M. und Zhong, L. (2009). Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila* and their roles in spermatogenesis. *Heredity* *103*, 23–31.
- Bendena, W.G., Ayme-Southgate, A., Garbe, J.C. und Pardue, M. L. (1991). Expression of heat-shock locus hsr-omega in nonstressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *144*, 65–77.
- Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G. und Sakkas, D. (2000). Sperm decondensation during fertilisation in the mouse: presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. *Zygote* *8*, 197–202.
- Bodenstein, D. (1950). The postembryonic development of *Drosophila*. In: Demerec, M. (Ed.), *Biology of Drosophila*. Wiley and Sons, USA, 275–364.
- Boutanaev, A.M., Mikhaylova, L.M. und Nurminsky, D.I. (2007). Up-regulation of the Ku heterodimer in *Drosophila* testicular cyst cells. *FEBS Lett.* *581*, 1707–1715.

- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Gen.* 28, 10–12.
- Brewer, L., Corzett, M., Lau, E.Y. und Balhorn, R. (2003). Dynamics of Protamine 1 binding to single DNA molecules. *J. Biol. Chem.* 278, 42403–42408.
- Cabrero, J., Palomino-Morales, R.J. und Camacho, J.P.M. (2007). The DNA-repair Ku70 is located in the nucleus and tail of elongating spermatids in grasshoppers. *Chromosome Res.* 15, 1093–1100.
- Carrell, D.T., Emery, B.R. und Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update* 13, 313–327.
- Caron, N., Veilleux, S. und Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 437–443.
- Champoux, J.J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369–413.
- Chintapalli, V.R., Wang, J. und Dow, J.A.T. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease. *Nature Gen.* 39, 715–720.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B. und Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86.
- Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W.D., Goulding, E.H., Stein, P., Xu, Z., Schultz, R.M., Hecht, N.B. und Eddy, E.M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.* 69, 211–217.
- Clarkson, M. und Saint, R. (1999). A His2AvDGFP fusion gene complements a lethal His2AvD mutant allele and provides an in vivo marker for *Drosophila* chromosome behavior. *DNA Cell. Biol.* 18, 457–462.
- Costelloe, T., FitzGerald, J., Murphy, N.J., Flaus, A. und Lowndes, N.F. (2006). Chromatin modulation and the DNA damage response. *Exp. Cell Res.* 312, 2677–2686.
- Cross, D.P. und Shellenbarger, D.L. (1979). The dynamics of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis in *in vitro* cultures. *J. Embryol. exp. Morph.* 53, 345–351.

- Degrassi, F., Fiore, M. und Palitti, F. (2004). Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumor drugs. *Curr. Med. Chem.* *4*, 317–325.
- Derijck, A., van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M. und de Boer, P. (2008). DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1922–1937.
- Doenecke, D., Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B., Franke, K., Gavenis, K., Kosciessa, U. und Witt, O. (1997). Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* *424*, 37–48.
- Dorus, S., Busby, S.A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. und Karr, T.L. (2006). Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat. Genet.* *38*, 1440–1445.
- Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B. und Doenecke, D. (1996). Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem. Cell. Biol.* *106*, 247–251.
- Fuller, M.T. (1993). Spermatogenesis. In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), *The development of Drosophila melanogaster*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York USA, 71–147.
- Fuller, M.T. (1998). Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Cell Dev. Biol.* *9*, 433–444.
- Galburt, E.A. und Stoddard, B.L. (2002). Catalytic mechanisms of restriction and homing endonucleases. *Biochemistry* *41*, 13851–13860.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M. und Schmid, C.W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* *236*, 962–964.
- van Gent, D.C. und van der Burg, M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* *26*, 7731–7740.
- Glickman, M.H. und Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* *82*, 373–428.

- Görisch, S.M., Wachsmuth, M., Tóth, K.F., Lichter, P. und Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J. Cell Sci.* *118*, 5825–5834.
- Gould-Somero, M. und Holland, L. (1974). The timing of RNA synthesis for spermiogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster* testes. *Wilhelm Roux' Archiv* *174*, 133–148.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. und Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* *271*, 3459–3469.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. und Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* *176*, 283–294.
- Grosse, F. und Manns, A. (1993). Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase (EC 6.5.1.3). In: Burrell, M.M. (Ed.), *Enzymes of Molecular Biology*. Humana Press, USA, 213–230.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T. und Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* *460*, 473–478.
- Haraguchi, C.M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Tokumoto, T., Hoshi, K. und Yokota, S. (2007). Possible function of caudal nuclear pocket: Degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. *J. Histochem. Cytochem.* *55*, 585–595.
- Hardy, R.W., Tokuyasu, K.T., Lindsley, D.L. und Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* *69*, 180–190.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.-K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., Khochbin, S. und Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* *79*, 950–960.

- Hecht, N.B. (1989). Mammalian protamines and their expression. In: Hnilica, H.S. (Ed.), Histones and other basic nuclear proteins. CRC Press, Boca Raton USA, 347–373.
- Hecht, N., Behr, R., Hild, A., Bergmann, M., Weidner, W. und Steger, K. (2009). The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis. Hum. Reprod. 24, 536–545.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J. und de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodelling of paternal chromatin. Dev. Biol. 298, 458–469.
- Holstein, A.F., Schulze, W. und Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 107–661.
- Jayaramaiah Raja, S. und Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* Protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of Sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. Mol. Cell. Biol. 25, 6165–6177.
- Kawamoto, T., Kawai, K., Kodama, T., Yokokura, T. und Niki, Y. (2008). Autonomous differentiation of *Drosophila* spermatogonia in vitro. Develop. Growth Differ. 50, 623–632.
- Kennedy, B.P. und Davies, P.L. (1980). Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. J. Biol. Chem. 255, 2533–2539.
- Kennedy, B.P. und Davies, P.L. (1981). Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. J. Biol. Chem. 256, 9254–9259.
- Kiefer, B.I. (1966). Ultrastructural abnormalities in developing sperm of *X/O Drosophila melanogaster*. Genetics 54, 1441–1452.
- Kimmins, S. und Sassonne-Corsi, P. (2005). Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. Nature 434, 583–589.

- Kuroda, Y. (1974). Spermatogenesis in pharate adult testes of *Drosophila* in tissue cultures without ecdysones. *J. Insect. Physiol.* *20*, 637–640.
- Kurtz, K., Martínez-Soler, F., Ausió, J. und Chiva, M. (2007). Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J. Cell. Biochem.* *102*, 1432–1441.
- Laberge, R.-M. und Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* *73*, 289–296.
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G.B. und Boissonneault, G. (2008). DNA Damage response during chromatin remodelling in elongating spermatids of mice. *Biol. Reprod.* *78*, 324–332.
- Lee, K.K. und Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 284–295.
- Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M. und Ausió, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* *111*, 473–482.
- Lewis, J.D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M.J., Chiva, M. und Ausió, J. (2004). Histone H1 and the origin of protamines. *PNAS* *101*, 4148–4152.
- Lieber, M.R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* *283*, 1–5.
- Liebrich, W. (1981). In vitro spermatogenesis in *Drosophila*. I. Development of isolated spermatocyte cysts from wild-type *D. hydei*. *Cell Tissue Res.* *220*, 251–262.
- Lindsley, D.L. und Lifschytz, E. (1972). The genetic control of spermatogenesis in *Drosophila*. In: Beatty, R.A. und Gluecksohn-Waelsch, S. (Eds.), *Proc. Int. Symp. The genetics of the spermatozoon*, Edinburgh. Edinburgh, New York, 203–222.
- Lindsley, D. und Tokuyasu, K.T. (1980). Spermatogenesis. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (Eds.), *Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2d. Academic Press, New York USA, 225–294.
- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T.L. und Couble, P. (2005). The histone 3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* *437*, 1386–1390.

- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Mai, A., Massa, S., Rotili, D., Cerbara, I., Valente, S., Pezzi, R., Simeoni, S. und Ragno, R. (2005). Histone deacetylation in epigenetics: An attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.* 25, 261–309.
- Marcon, L. und Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: New insights in stage specificity and link to chromatin remodelling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- McMurray, C.T. und Kortun, I.V. (2003). Repair in haploid male germ cells occurs late in differentiation as chromatin is condensing. *Chromosoma* 111, 505–508.
- McPherson, S. und Longo, F.J. (1993). Chromatin structure-functions alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem.* 37, 109–128.
- Mehnert, J.M. und Kelly, W.K. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Biology and Mechanism of Action. *Cancer J.* 13, 23–29.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R. und Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483–488.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H.B., Elofsson, M., Sin, N. und Crews, C.M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10403–10408.
- von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 119, 1977–1984.
- Miller, D., Brinkworth, M. und Iles, D. (2009). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? *Reproduction elektronische Vorabveröffentlichung*.
- Mimitou, E.P. und Symington, L.S. (2009). DNA end resection: Many nucleases make light work. *DNA Repair* 8, 983–995.

- Nagy, Z. und Soutoglou, E. (2009). DNA repair: easy to visualize, difficult to elucidate. *Trends Cell Biol.* *19*, 617–629.
- Nair, M., Nagamori, I., Sun, P., Mishra, D.P., Rhéaume, C., Li, B., Sassone-Corsi, P. und Dai, X. (2008). Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Dev. Biol.* *320*, 446–455.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. und Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* *31*, 137–155.
- Noguchi, T. und Miller, K.G. (2003). A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* *130*, 1805–1816.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Upd.* *12*, 417–435.
- Oliva, R. und Mezquita, C. (1982). Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res.* *10*, 8049–8059.
- Olivieri, G. und Olivieri, A. (1965). Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* *2*, 366–380.
- Olsen, A-K., Lindemann, B., Wiger, R., Duale, N. und Brunborg, G. (2005). How do male germ cells handle DNA damage? *Tox. Appl. Pharma.* *207*, S521–S531.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. und Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5354–5365.
- Rabinowitz, M. (1941). Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* *69*, 1–49.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R. und Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* *120*, 1689–1700.
- Rathke, C., Barckmann, B., Burkhard, S., Jayaramaiah-Raja, S., Roote, J. und Renkawitz-Pohl, R. (2010). Distinct functions of Mst77F and protamines in

- nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. Eur. J. Cell. Biol. 89 in Druck.
- Raukas, E. und Mikelsaar, R.-H. (1999). Are there molecules of nucleoprotamine? BioEssays 21, 440–448.
- Renkawitz-Pohl, R., Hollman, M., Hempel, L. und Schäfer, M.A. (2005). Spermatogenesis. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology. Vol. 1 Elsevier, Oxford UK, 157–177.
- Ripp, C. (2009). Chromatin remodelling during spermiogenesis: Characterization of the mutant *snowballs* and analyses of topoisomerase expression during the switch from histones to protamines. Master-Arbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samejima, K. und Earnshaw, W.C. (2005). Thrashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 677–688.
- Sasnauskas, G., Zakrys, L., Zaremba, M., Cosstick, R., Gaynor, J.W., Halford, S.E. und Siksnys, V. (2010). A novel mechanism for the scission of double-stranded DNA: Bfil cuts both 3'-5' and 5'-3' strands by rotating a single active site. Nucleic Acids Res. elektronische Vorabveröffentlichung.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. Science 296, 2176–2178.
- Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X. und Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET subfamily of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. Development 134, 3507–3515.
- Shields, G. und Sang, J.H. (1977). Improved medium for culture of *Drosophila* embryonic cells. Drosophila Information Service 52, 161.

- Shirley, C.R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yangimachi, R. und Meistrich, M.L. (2004). Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* *71*, 1220–1229.
- Sng, J.H., Heaton, V.J., Bell, M., Maini, P., Austin, C.A. und Fisher, L.M. (1999). Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase IIalpha and IIbeta genes: evidence for isoform evolution through gene duplication. *Biochim. Biophys. Acta* *1444*, 395–406.
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. und Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* *34*, 384–390.
- Steger, K., Fink, L., Failing, K., Bohle, R.M., Kliesch, S., Weidner, W. und Bergmann, M. (2003). Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol. Hum. Reprod.* *9*, 331–336.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S. und Price, B.D. (2006). Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett.* *580*, 4353–4356.
- Thomas, T., Loveland, K.L. und Voss, A.K. (2007). The genes coding for the MYST family histone acetyltransferases, Tip60 and Mof, are expressed at high levels during sperm development. *Gene Expr. Patt.* *7*, 657–665.
- Tokuyasu, K.T., Peacock, W.J. und Hardy, R.W. (1972). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *127*, 492–525.
- Tokuyasu, K.T. (1975). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of „onion“ Nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.* *53*, 93–112.
- Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L. und Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* *21*, 2084–2089.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H. und The Flyba-

- se Consortium (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nuc. Acids Res.* *37*, D555–D559.
- Venables, J.P. und Eperon, I.C. (1999). The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *9*, 346–354.
- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 430–440.
- Ward, W.S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* *48*, 1193–1201.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P. und Sautière, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* *80*, 117–128.
- Wu, L. und Belasco, J.G. (2008). Let me count the ways: Mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* *29*, 1–7.
- Yamashita, Y.M., Jones, D.L. und Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* *301*, 1547–1550.
- Yu, J., Pacifico, S., Liu, G. und Finley, R.L. Jr. (2008). DroID: the *Drosophila* Interactions Database, a comprehensive resource for annotated gene and protein interactions. *BMC Genomics* *9*, 461.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S. und Meistrich, M.L. (2004). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol. Reprod.* *71*, 1016–1025.
- Zhong, L. und Belote, J.M. (2007). The testis-specific proteasome subunit Pro α 6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* *134*, 3517–3525.

Anhang A

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	mM	Millimolar (mmol/l)
mA	Milliampère (10^{-3} A)	OD _x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> destilliertes Wasser	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> zweifach destilliertes Wasser	pH	$\text{pondus hydrogenii} \hat{=} -\log_{10} c [H_3O^+]$
bp	Basenpaare	RT	Raumtemperatur
kb	Kilobasenpaare (10^3 bp)	RFP	engl. <i>red fluorescent protein</i>
ca.	circa	RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
DNA	Deoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)	mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger-RNA</i>)
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat	S.	Seite
elong.	elongierend	sek	Sekunde
engl.	englisch	sog.	sogenannt
et al.	<i>et alii</i> , und andere	Tab.	Tabelle
evtl.	eventuell	TNP	Transitionsprotein
°C	Grad Celsius	TUNEL-	<i>terminal dUTP transferase nick end</i>
g	Gramm	Assay	<i>labeling assay</i>
kg	Kilogramm (10^3 g)	U	Unit
mg	Milligramm (10^{-3} g)	UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm (10^{-6} g)	upm	Umdrehungen pro Minute
ng	Nanogramm (10^{-9} g)	UTR	untranslatierte Region
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>	vgl.	vergleiche
h	Stunde	V	Volt
HDAC	Histon-Deacetylase	Vol	Volumen
l	Liter	(v/v)	<i>volume per volume</i>
ml	Milliliter (10^{-3} l)	(w/v)	<i>weight per volume</i>
μl	Mikroliter (10^{-6} l)	WT	Wildtyp
m	Meter	z.B.	zum Beispiel
cm	Zentimeter (10^{-2} m)		
mm	Millimeter (10^{-3} m)		
nm	Nanometer (10^{-9} m)		
min	Minute		
M	Molar (mol/l)		

Anhang B

Lebenslauf

Anhang C

Danksagung

Anhang D

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Histon-Acetylierung ist essentiell für die Spermatidenentwicklung von histonbasiertem zu protaminbasiertem Chromatin in Drosophila melanogaster

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22. Februar 2010
